（　計　　画　　書　）

環境技術実証モデル事業
化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

# 化学物質に関する簡易モニタリング技術
# 実証試験計画書

| | |
|---|---|
| 環境技術開発者 | 株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー |
| 技術・製品の名称 | 技術：ELISA法（酵素免疫測定法）<br>製品の名称：イプロジオン測定キットＥ |

平成１７年１０月

愛　　知　　県

## はじめに

本実証試験計画書は、「化学物質に関する簡易モニタリング技術　実証試験要領（第２版）（平成17 年 5 月 16 日　環境省総合環境政策局）」（以下、「実証試験要領」という。）に基づいて選定された実証対象技術について、実証機関及び環境技術開発者の２者が協議、合意の上、実証試験要領に準じて策定したものである。


（実証機関）

愛知県環境調査センター

所長　近藤　徳雄

（環境技術開発者）

株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー

代表取締役　河野 猛

目　次

付録１：取扱説明書

付録２：開発者による性能試験結果

付録３：参考となるその他の文書やデータ等

付録４-１：品質管理マニュアルＥＬＩＳＡ法（イプロジオン）

付録４-２：品質管理マニュアル機器分析法（イプロジオン）

付録５：イプロジオン物性表

# １．実証試験の概要と目的

## １.1 実証試験の概要と目的

既に適用可能な段階にありながら、環境保全効果等についての客観的な評価が行われていないために普及が進んでいない先進的環境技術について、その環境保全効果等を第三者が客観的に実証する事業をモデル的に実施することにより、環境技術実証の手法・体制の確立を図るとともに、環境技術の普及を促進し、環境保全と環境産業の発展に資することを目的とするものである。

本実証試験は、平成 17 年 5 月 16 日　環境省総合環境政策局が策定した実証試験要領に基づいて選定された実証対象技術について、同実証試験要領に準拠して実証試験を実施することで、製品性能の信頼性等を客観的に実証するものである。

本実証試験の化学物質簡易モニタリング技術とは、操作・管理の容易性や定量の高感度化などの特徴をもったもので、スクリーニング的な活用や簡易な方法で異常値を監視できることなどへの有用性が期待できるものを指すものとする。

対象とする技術は、一般環境モニタリングでの利活用の可能性を念頭に、以下の条件に該当するものとして、抗原抗体反応を応用した酵素標識免疫測定法（ＥＬＩＳＡ法）による簡易分析技術とする。

ここでは、対象とする化学物質から、環境省で別途検討が進められているダイオキシン類を除外するものとする。

## 1.2 実証試験の種類

本実証試験では、以下の視点から実証を行うものとする。

- 製品性能の信頼性
- 一般環境モニタリングでの実用性
- 製品操作等の簡便性

## 2．実証試験参加組織と実証試験参加者の責任分掌

### 2.1 実証試験参加組織

実証試験に参加する組織は、下表に示すとおりである。

**表2.1.1　実証試験参加組織**

| | | |
|---|---|---|
| 実証機関 | 団体名 | 愛知県環境調査センター |
| | 住所 | 〒462-0032　名古屋市北区辻町字流 7-6 |
| | 担当者所属・氏名 | 応用化学部　部長　角脇　怜 |
| | 電話番号 | 052-910-5494 |
| | FAX 番号 | 052-991-6241 |
| | E-mail アドレス | satoshi_kadowaki@pref.aichi.lg.jp |
| 環境技術開発者 | 企業名 | 株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー |
| | 住所 | 〒601-8315 京都市南区吉祥院車道町 48 番地 |
| | 担当者所属・氏名 | 試薬事業部　開発・製造部　伊東　茂壽 |
| | 電話番号 | 075-692-1786 |
| | FAX 番号 | 075-692-1790 |
| | E-mail アドレス | Shigekazu.ito@horiba.com |

### 2.2 実施体制

実証試験の実施体制は、下図に示すとおりである。

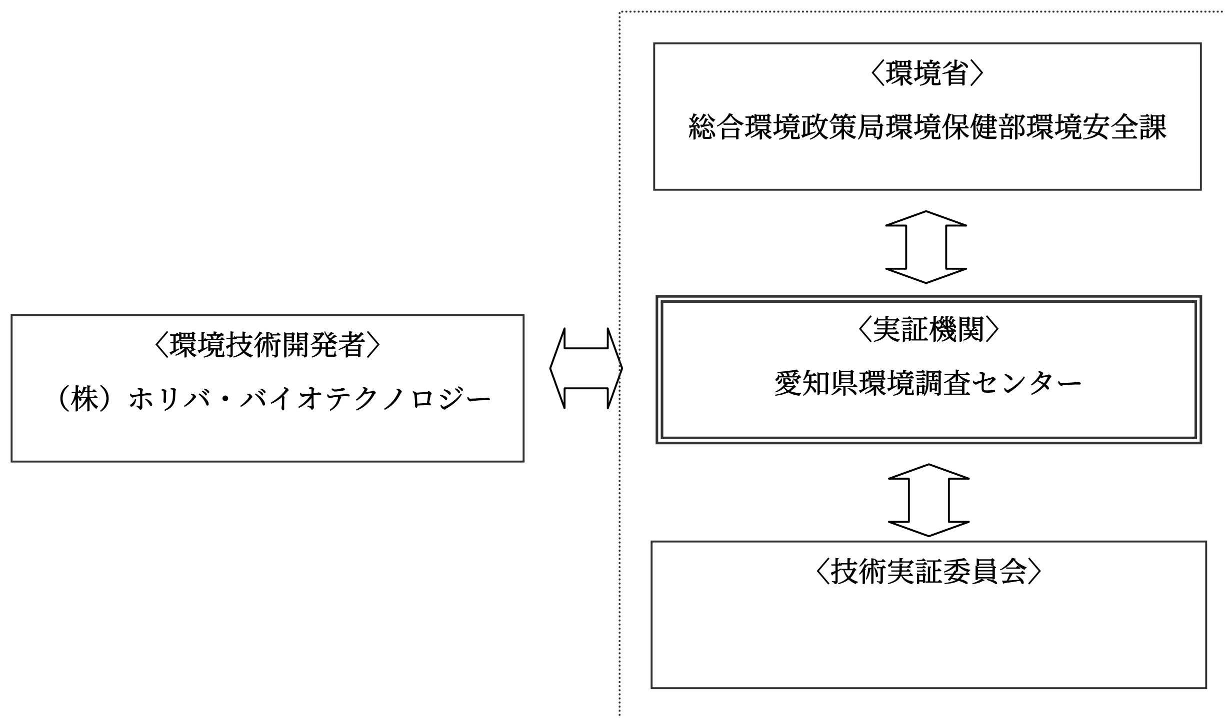



**図 2.2　実証試験の実施体制**

## 2.3 実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加者とその責任分掌は、下表に示すとおりである。

**表2.3　実証試験参加者の責任分掌**

| 実証試験参加機関 | 責任分掌 | 参加者 | |
|---|---|---|---|
| | | 部署 | 氏名 |
| 実証機関 | 実証試験の全体の総括責任者 | 応用化学部長 | 角脇　怜 |
| | 実証試験における ELISA 法の総括責任者 | 技師 | 小川　敏幸 |
| | 実証試験における ELISA 法担当者 | 技師 | 中根　知康 |
| | 実証試験における ELISA 法担当者 | 技師 | 嶋田　深志 |
| | 実証試験における機器分析の総括責任者 | 主任研究員 | 宇佐見　義博 |
| | 実証試験における機器分析担当者 | 技師 | 小川　敏幸 |
| | 実証試験における機器分析担当者 | 技師 | 中根　知康 |
| | 実証試験における機器分析担当者 | 技師 | 嶋田　深志 |
| | 実証試験における精度管理の総括責任者 | 応用化学部長 | 角脇　怜 |
| | 実証試験における精度管理担当者 | 主任研究員 | 宇佐見　義博 |
| | 実証試験における精度管理担当者 | 技師 | 小川　敏幸 |
| | 実証試験品質管理者 | 環境調査センター研究監 | 田村　栄一 |
| 環境技術開発者 | 実証対象製品全体の総括責任者 | 開発・製造部部長 | 伊東 茂壽 |
| | 実証対象製品の提供 | 開発・製造部次長 | 門脇 篤 |
| | 実証対象製品の取扱説明書等の提供 | 開発・製造部部長 | 伊東 茂壽 |
| | 実証試験実施上の参考情報の提供 | 開発・製造部次長 | 門脇 篤 |

## ３．実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要

### 3.1 実証対象技術の原理

この実証対象製品は、申請者が開発したイプロジオンに対する特異的なモノクローナル抗体を応用した、環境水、農産物中のイプロジオン測定キットである。

ELISA の原理は、競合反応（測定対象物質濃度が高い試料では吸光度が低く、濃度が低い試料では吸光度が高い）で、マイクロプレート（96 ウェル）を使用したキットである。

### 3.2 実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、下表に示すとおりである。

**表 3.2　実証対象製品のデータ**

| 項目 | 記　入　欄 |
|---|---|
| 製品名 | イプロジオン測定キットＥ |
| 型番 | EL101-01 |
| 販売・製造元 | 株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー |
| 重量（キット一式、g） | 350g |
| 価格（円） | 105,000 円 |
| 分析対象物質 | イプロジオン |
| 対象環境媒体 | 水質・底質・生物・その他（農産物） |
| 利用用途 | 残留農薬測定、環境水モニタリング |
| 標準試薬・種類 | 付属（調製済／調製要） |
| 操作環境（室温） | 室温（１５～２５℃） |
| 製品保管条件 | ４～８℃ |
| 製品保証期間 | 製造後７ヶ月間 |
| 同時測定数（最多） | 46 試料（n=2 で 1 キット使用時） |
| 測定時間 | 2~3 時間（固相抽出等の前処理時間を除く） |

| 項目 | 記　入　欄 |
|---|---|
| １．基本的な性能 | |
| ①測定範囲 | 1.5～30μg/L |
| ②検出下限及び定量下限 | （記載なし） |
| ③繰返し再現性 | 標準偏差：0.4～0.9　変動係数：4.0～4.2 % |
| ④日間再現性 | 標準偏差：0.67～1.55　変動係数：7.0～7.1 % |
| ⑤期間再現性 | 保存安定性（付録２） |
| ⑥プレート間再現性 | （記載なし） |
| ⑦交差反応性 | 2.1% (イプロジオン代謝物) |
| ⑧その他 | （記載なし） |
| ２．実用的な性能 | |
| ①回収特性 | 回収率:87.1～91.4% |
| ②測定精度等 | （記載なし） |
| ③その他 | （記載なし） |
| 試験責任者 | 伊東　茂壽 |
| 試験年月日 | 平成１５年６月３０日 |

以下の項目については、付録１～３に添付する。

付録１：取扱説明書

付録２：開発者による性能試験結果

付録３：参考となるその他の文書やデータ等

## ４．実証試験のデザイン

### 4.1 実証試験の期間

実証試験の期間は、平成 17 年 10 月 3 日～平成 18 年 2 月第 1 週とする。また、その期間のスケジュールは、下表に示すとおりである。

**表 2.1.1　実証試験のスケジュール（予定）**

| | 10 月 | | | | 11 月 | | 12 月 | 1 月 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2 週 | 3 週 | 4 週 | 5 週 | 1 週 | 2 週 | 3 週 | 1 週 |
| 実証試験計画の策定 | ○ | | | | | | | |
| 対象技術の選定、計画書案作成 | ○ | | | | | | | |
| 実証試験計画書策定、承認 | | ○ | | | | | | |
| 実証試験の実施 | | | | | | | | |
| 測定範囲の検討 | | | ○ | | | | | |
| 検出限界及び定量限界の検討 | | | ○ | | | | | |
| 繰返し再現性の検討 | | | ○ | | | | | |
| 日間再現性の検討 | | | ○ | | | | | |
| 期間再現性の検討 | | | ○ | | | | | |
| プレート間再現性の検討 | | | ○ | | | | | |
| 交差反応性の検討 | | | | ○ | | | | |
| 回収特性の検討 | | | | ○ | ○ | | | |
| 測定精度の検討 | | | | ○ | ○ | | | |
| 内部監査の実施 | | | | | ○ | | | |
| 実証試験結果中間報告 | | | | | | ○ | | |
| 実証試験結果報告 | | | | | | | ○ | ○ |
| 技術実証委員会の実施 | ○ | | | | | ○ | ○ | ○ |

## 4.2 実証試験の内容

実証試験項目の内容は、表 4.2 のとおりである。

表 4.2 実証項目の内容

| 項目 | 内容 |
|---|---|
| 1．基本的な性能 | |
| (1)測定範囲 | 提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の変動等に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。 |
| (2)検出下限及び定量下限 | 提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の標準偏差に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。 |
| (3)繰返し再現性 | 提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。 |
| (4)日間再現性 | 提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なる条件（日付）での同一操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。 |
| (5)期間再現性 | 提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて製造後一定期間経過した製品の操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。 |
| (6)プレート間再現性 | 提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なるロットや異なるプレート間での ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。 |
| (7)交差反応性 | 提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて類似物質別の ELISA 測定値の相違等に基づき、交差反応性を実証する。 |
| 2．実用的な性能 | |
| (1)回収特性 | 提出書類の内容、環境試料を模擬し市販標準品で混合調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の比較に基づき、回収特性を実証する。 |
| (2)測定精度 | 環境試料（濃度未知）を用いた ELISA 測定値の変動や操作手順・操作方法の特徴等に基づき、測定精度、前処理妥当性、操作簡便性等による環境試料への適用性を実証する。 |

### 4.3 実証対象製品の受け入れと管理

**(1) 実証対象製品（ELISA キット）の受け入れ**

ELISA キット受領時の状態について、搬入者の立ち会いの元に、受領の記録を ELISA キット管理表（様式 4.3）に記入し、以下の事項を確認する。

〇管理表と ELISA キットの品名、数量が一致していること。

〇ELISA キットの搬送が適切に取り扱われていること。

〇ELISA キットに不適合又は疑義を発見したときは、搬入者と協議し適切な処置をとる。

**(2) ELISA キットの管理**

〇ELISA キットは、変質しないように、取扱説明書に記載された保管条件で適切に保管・管理する。

〇ELISA キットの分轄を行う場合は、汚染や品質低下のない方法で行い、識別番号等必要な表示を行うとともに、分轄の年月日その他必要な事項を管理表に記録する。

## ELISA キット管理表（様式 4.3）

受領年月日　　　　　時　　分　　　　　　　　搬入者

番号（管理番号）　　　ー
メーカー名
品名
Lot. No.

搬入時確認事項

- □ 包装等に破損がない
- □ 保管温度（　　℃）
- □ 搬入時の温度管理
- □ 使用期限
- □ その他異常なし

保管場所
保管温度　　　　℃

受領者

（移動・分轄等の記録）

番号（管理番号）　　　ー
メーカー名
品名
Lot. No.

搬入時確認事項

- □ 包装等に破損がない
- □ 保管温度（　　℃）
- □ 搬入時の温度管理
- □ 使用期限
- □ その他異常なし

保管場所
保管温度　　　　℃

受領者

（移動・分轄等の記録）

**4.4 実証試験の方法**

基本的な性能試験及び実用的な性能試験において、以下の操作は共通である。

ア．製品の操作

製品の操作にあたっては、製品の取扱説明書を遵守するとともに、「品質管理システム」（付録4）の試験操作手順（一般的な事項）に従って行う。

イ．検量線作成用標準溶液の調製

キットに付属する標準試薬を用い、キットが指定する調整方法に従い、濃度系列（以下、指定濃度系列）を作成する。

ウ．吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（TECAN 社製サンライズリモート）で測定し、指定濃度系列及び各試験用試料溶液の吸光度とする。

エ．検量線の作成

波長 450nm で測定した標準溶液指定濃度系列の吸光度（３重測定の平均値）から、4-parameter logistic fitting 後、検量線を作成する（検量線作成用の解析ソフト：和光純薬（株）製 LS-PLATEmanager 2004)。

オ．実測濃度の算出

エ．で作成した検量線を用いて、各試験用試料溶液の吸光度から各実測濃度を算出する。

### （1）基本的な性能試験

実証対象製品の基本的な性能を検討するため、製品仕様の信頼性等の観点から市販標準品（以下、市販標準物質）で調製した試験用試料溶液を用いた実証試験を行う。

○試験用試料溶液の調製

イプロジオンの市販標準物質（和光純薬製 イプロジオン標準品（残留農薬試験用））を用いて、10%メタノールを希釈溶媒として、試験用試料溶液を作成する。

標準溶液指定濃度系列及び試験用試料溶液の調製濃度は、表 4.4.1 のとおりである。

表 4.4.1　標準溶液指定系列及び試験用試料溶液

| 試験項目 | 物質名 | 試料名及び試料溶液調製濃度（μg/L） |
|---|---|---|
| 標準溶液指定濃度系列（要調製） | ｲﾌﾟﾛｼﾞｵﾝ | 0，1.5，4.5，15，30 |
| ①測定範囲<br>④日間再現性<br>⑤期間再現性<br>⑥プレート間再現性 | ｲﾌﾟﾛｼﾞｵﾝ | 0，1.5，4.5，15，30 |
| ②検出下限及び定量下限 | ｲﾌﾟﾛｼﾞｵﾝ | 1.5 |
| ③繰返し再現性 | ｲﾌﾟﾛｼﾞｵﾝ | 7.0 |
| ⑦交差反応性 | ｲﾌﾟﾛｼﾞｵﾝ<br>ｲﾌﾟﾛｼﾞｵﾝ代謝物<br>ﾌﾟﾛｼﾐﾄﾞﾝ | 0，1.5，4.5，15，30<br>0，10，100，500，2000，10000<br>0，10，100，500，2000，10000 |

#### ①　測定範囲

調製した指定濃度範囲の試験用試料溶液を用いて、各調製濃度につき 3 重測定を行い、3 個の吸光度それぞれから求めた実測濃度より、平均値、標準偏差、変動係数を求める。

これを基に、調製濃度と実測濃度との比較、指定された測定範囲の妥当性などについて検討する。

#### ②　検出下限及び定量下限試験

調製した指定濃度系列の下限付近の 1 濃度を 8 回測定し、3 重測定の平均吸光度から算出した 8 個の実測濃度より標準偏差（SD）を求める。求めた SD から得られた 3SD 及び 10SD をそれぞれ検出

下限及び定量下限とし、申請データと比較検討する。

**③　繰返し再現性試験**

調製した指定濃度系列内の中央付近の１濃度を３重測定で８回測定し、３重測定の平均吸光度から算出した８個の実測濃度より平均値、標準検査、変動係数(CV)を求める。

求めた変動係数（CV、n=8）から、繰返し再現性について製品仕様の妥当性を検討する。

**④　日間再現性試験**

（同一測定者が）1週間の異なる3日間において、同一ロットの異なるプレートを用いて「①測定範囲試験」と同じ測定操作・検討を行う。各調製濃度について得られたプレート毎の実測濃度の平均値、変動係数を求め、3日間の結果の比較から製品仕様の妥当性を検討する。

**⑤　期間再現性試験**

1ヶ月以上離れた製造年月日の2枚のプレートを用いて、（同一測定者が）同時に「①測定範囲試験」と同じ測定操作・検討を行う。各調製濃度について得られた各プレートの実測濃度の平均値、変動係数を求め、その結果の比較から製品仕様の期間再現性の妥当性を検討する。

**⑥　プレート間再現性試験**

同一ロット2プレート及び異なるロット1プレートの3プレートを用いて、（同一測定者が）同時に「①測定範囲試験」と同じ測定操作・検討を行う。各調製濃度について得られた3プレートの実測濃度の平均値及び変動係数の比較から、同一ロット及び異なるロットでのプレート間再現性について製品仕様の妥当性を検討する。

**⑦　交差反応性試験**

イプロジオン及び類似物質（イプロジオン代謝物、プロシミドン）を用いて、指定濃度系列で吸光度曲線（実測値は3重測定の平均値から求める）を描き、吸光度曲線から類似物質（イプロジオン代謝物、プロシミドン）の50%発色阻害濃度を求める。（イプロジオンの50%阻害濃度/類似物質の50%阻害濃度）×100（%）で交差率を求め、類似物質の交差反応性を検討する。

類似物質に関して、指定濃度系列のみでは50%発色阻害濃度が求められない場合は、50%発色阻害濃度が得られるように高濃度側を加えた濃度系列を作り、試験をやり直す。予想される高濃度側の濃度範囲が実用的でない場合には、20または10%阻害濃度で代用する。

**（２）実用的な性能試験**

実証対象製品の実用的な性能を検討するため、環境試料への適用性等の観点から環境試料試験による実証試験を行う。

① 回収特性試験

グラスファイバーフィルター（GF/C：孔径 1.2μm）を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、それに指定濃度範囲の中央付近の１濃度となるように市販標準物質（イプロジオン）を添加するとともに、妨害物質として標準フミン質を一定濃度添加して、試験用試料溶液を調製する。試験用試料溶液の調製濃度は、表 4.4.2 のとおりである。

調製した試験用試料溶液について、３重測定した実測濃度から平均値、標準偏差、変動係数、回収率を求め、フミン質に対する製品の回収特性を検討する。

表 4.4.2 試験用試料溶液

| 物質名 | 試料名及び調製濃度 |
|---|---|
| 分析対象物質：イプロジオン | 7.0 μg/L |
| 妨害物質：フミン酸 | 1，5，10，50 mg/L |

② 測定精度試験

複数の河川地点から得られた河川水について、イプロジオンを測定する。但し、必要に応じて固層抽出等による前処理操作を行う。

同一試料について、所定のマニュアル（前処理法を含む）に従って機器分析を行い、ELISA と機器分析の実測値を比較し（相関係数及び回帰式）、検討する。

また、製品仕様の前処理の妥当性（操作時間、操作ステップ数、操作の難易）及び操作簡便性（測定時間、操作ステップ数、標準溶液・反応液の調製の難易）について、環境試料への適用性の観点から検討する。

## ５．データの品質管理

**（１）測定操作の記録**

ア．実証試験過程で入手、作成した文書（デジタル画像を含む）及び記録については適切に管理・保管する。

イ．実証項目の試験は、「品質管理マニュアル」（付録 4）に従って行い、その分析作業台帳及び分析機器の点検事項等は、記録に残す。

**（２）データ処理の管理**

ア．試験データの計算や転記について、当該実施者以外の監督者によるチェックを行い、記録を残す。

イ．試験データをコンピュータにデータファイルとして保存する場合には、関係のない者がデータファイルにアクセスしないように制限する。データ入力の記録を残し、無許可のデータ修正を予防する。

ウ．データファイルの紛失の可能性があるときは、バックアップを取りデータを保護する。

## ６．データの管理、分析、表示

### 6.1 データ管理

(1)データの管理とその方法

本実証試験から得られる以下のデータは､｢品質管理マニュアル｣に従って管理するものとする。

また、本実証試験の品質管理者は、環境調査センター　研究監　田村　栄一とする。

### 6.2 データ分析と表示

本実証試験で得られたデータについては、必要に応じ統計分析の処理を実施するとともに、使用した数式を実証試験結果報告書に記載する。

実証項目の測定結果の分析・表示方法は以下のとおりである。

(1)基本的な性能試験

①測定範囲

・調製濃度と実測濃度との相対値、実測濃度の変動係数

②測定下限及び定量下限

・実測濃度の標準偏差

③繰返し再現性

・実測濃度の変動係数

④日間再現性

・実測濃度の変動係数

⑤プレート間再現性

・実測濃度の変動係数

⑥期間再現性

・調製濃度と実測濃度との相対値、実測濃度の変動係数

⑦交差反応性

・類似物質の交差反応率

(2)実用的な性能試験

①回収特性

・調製濃度と実測濃度の比率（回収率）

②測定精度

・ELISA の実測濃度と機器分析の実測濃度との相関係数及び回帰式

## ７．評価

本実証試験で得られたデータの品質監査は、「品質管理マニュアル」（付録 4）に従って行うものとする。

実証試験が適切に実施されていることを確認するために実証試験の期間中に１回内部監査を実施する。

この内部監査は、企画情報部長　高梨　俊治を内部監査員として任命し実施する。

内部監査員は、内部監査の結果を品質管理責任者及び愛知県環境調査センター所長に報告する。

付録１：取扱説明書

付録２：開発者による性能試験結果

付録３：参考となるその他の文書やデータ等

付録４-１：品質管理マニュアルＥＬＩＳＡ法（イプロジオン）

付録４-２：品質管理マニュアル機器分析法（イプロジオン）

付録５：イプロジオン物性表

付録１　取扱説明書

研究用試薬

スマートアッセイ シリーズ
# イプロジオン測定キットE

Ver 1

## １．はじめに

本品は、抗原であるイプロジオンと、その抗体との特異的反応を利用した酵素免疫測定法（Enzyme - Linked Immunosorbent Assay、ELISA ）によるイプロジオンの測定キットです。イプロジオンの測定に必要な全ての試薬をパッケージしており、煩雑な試薬調製の必要がなく、測定したい時にすぐにお使いいただけます。

## ２．測定原理

本キットは、環境水中のイプロジオンを直接競合ELISA法で測定するものです。

イプロジオンと特異的に反応する抗体を固相化したマイクロプレートに、イプロジオン（標準溶液または試料溶液）とイプロジオン酵素標識物溶液の等量混合液を加えて競合反応させます。反応終了後、未反応物を洗浄除去し発色試薬を加えると、固相化抗体に結合した酵素標識物の酵素反応によって発色試薬中のテトラメチルベンジジンが酸化され、発色します。発色反応を発色停止試薬で停止させた後、450 nmの吸光度を測定します。吸光度は、標準溶液または試料溶液中のイプロジオン濃度が高いほど低下します。標準溶液のイプロジオン濃度とその吸光度の関係からイプロジオン濃度を求めます。

## ３．測定キットの特徴

1)高感度－イプロジオンを 1.5～30 ppb の範囲で測定で測定できます。
2)簡　便－機器分析法に比べ試料の煩雑な前処理を必要とせず、簡易な操作で測定できます。
3)迅　速－前処理が簡単なため、短時間で多くの試料を同時に測定できます。
4)低コスト－高価な機器を必要とせず、測定場所を特に選ばないため、コストを安くできます。

## ４．測定キットの構成

１キットに含まれる試薬の内訳は、第１表の通りです。

## ５．測定に必要な材料・装置

（1）試薬
①イプロジオン測定キットＥ：ホリバ・バイオテクノロジー社製
②精製水
③メタノール：環境分析用
④10%メタノール：精製水を用いて 10 倍希釈

（2）器具
①マイクロピペット（50～200 µL,1000 µL）および専用チップ
②メスシリンダー：500 mL
③試験管：ガラス製、10 mL
④ガラス繊維フィルター（ADVANTEC 社製 GLASS FIBER FILTER GA-55 または同等品）

（3）装置
①ストップウォッチ：秒単位まで表示
②試験管ミキサー
③マイクロプレートリーダー：スマートリーダー(ホリバ・バイオテクノロジー社製)
④マイクロプレート洗浄機：スマートウォッシャー(ホリバ・バイオテクノロジー社製)

## ６．溶液の調製

（1）イプロジオン抗体プレート
そのまま用います。

（2）イプロジオン標準溶液
イプロジオン標準試薬 C1、C2、C3 および C4 に 10%メタノール１ mL をマイクロピペットで加えて溶解し、それぞれイプロジオン標準溶液 C１から C４とします。溶解後の濃度は、それぞれ 1.5、4.5、15 および 30 ppb です。

（3）イプロジオン酵素標識物溶液
酵素標識物試薬に精製水６ mL を加えて溶解し、イプロジオン酵素標識物溶液とします。

（4）洗浄溶液
洗浄試薬に、精製水 450 mL をメスシリンダーで加えて希釈し、洗浄溶液とします。

第１表　キットの構成

| | 品名 | 容量 | 剤型 | 数量 |
|---|---|---|---|---|
| ① | イプロジオン抗体プレート | ８ウエル×12 列(96 ウエル) | 乾燥品 | １枚 |
| ② | イプロジオン標準試薬C１（1.5 ppb） | 1 mL | 凍結乾燥品 | 2 バイアル |
| ③ | イプロジオン標準試薬C２（4.5 ppb） | 1 mL | 凍結乾燥品 | 2 バイアル |
| ④ | イプロジオン標準試薬C３（15 ppb） | 1 mL | 凍結乾燥品 | 2 バイアル |
| ⑤ | イプロジオン標準試薬C４（30 ppb） | 1 mL | 凍結乾燥品 | 2 バイアル |
| ⑥ | イプロジオン酵素標識物試薬 | 6 mL | 凍結乾燥品 | 2 バイアル |
| ⑦ | 洗浄試薬(10 倍濃縮) | 50 mL | 液体 | 1 バイアル |
| ⑧ | 発色試薬 | 13 mL | 液体 | 1 バイアル |
| ⑨ | 発色停止試薬 | 13 mL | 液体 | 1 バイアル |
| ⑩ | プレートシール | | | １枚 |

（５）発色試薬
　そのまま用います。
（６）発色停止試薬
　そのまま用います。

## ７．測定操作

1）　測定方法

ろ　過
試料をガラス繊維フィルター等を用いてろ過し、メタノール10%溶液を調製し、試料溶液とします。

↓

混合液の調製
イプロジオン標準溶液または試料溶液 150μL をマイクロピペットで試験管に取り、それぞれにイプロジオン酵素標識物溶液 150μL をマイクロピペットで加えて混合し、標準混合液または試料混合液とします。

↓

競合反応
抗体プレートのウェルに、標準混合液または試料混合液 100 μL ずつをマイクロピペットで分注します。ついで、ストリップの使用ウェルに合わせて切断したプレートシールを貼り、室温(15～25℃)で１時間反応させます。
※専用のマイクロプレートリーダー“スマートリーダー”を用いて測定を行う場合は、標準混合液の配置が決まっていますので、リーダーの取扱説明書に従って使用して下さい。

↓

プレートの洗浄
反応液を吸引除去し、洗浄溶液 300 μL で 3 回洗浄します。
※ウェルの底に洗浄溶液が残っていないことを確認して下さい。
※測定の迅速性と定量精度を高めるため、専用の洗浄機のご使用をお勧めします。

↓

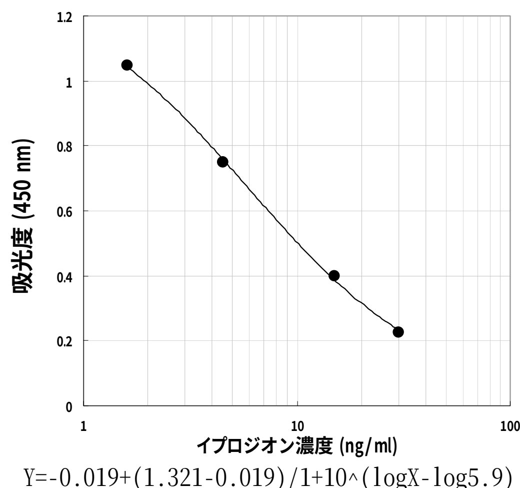
発色反応､発色反応停止
マイクロピペットで発色試薬 100 μL を加えて室温(15～25℃)で 10 分間反応させた後、発色停止試薬 100 μL をマイクロピペットで添加して下さい。
※各ウェルの発色反応時間が一定になるように注意して下さい。
※発色試薬を加えると時間と共に青色に、発色停止試薬を加えると瞬時に黄色に呈色します。

↓

吸光度測定
波長 450 nm における吸光度を、マイクロプレートリーダーにより測定します。
※発色停止後、１５分以内に吸光度を測定して下さい。
※“スマートリーダー”を使用いただくことにより、煩雑な濃度計算が自動的になされ、表示されます。

２）試料中のイプロジオン濃度の計算

回帰式によって算出します。リーダーに付属している演算ソフト等により回帰式を求め、濃度を算出して下さい。式のＹに試料の吸光度を代入しイプロジオン濃度（Ｘ）を求めることができます。専用のマイクロプレートリーダー“スマートリーダー”を用いて算出した回帰曲線と式を例として第１図に示します。




Y=-0.019+(1.321-0.019)/1+10^(logX-log5.9)

図１　回帰曲線および回帰式の例

## ８．測定キットの反応特性

本キットに用いている抗体の各種農薬に対する交差反応は、第２表の通りです。

第２表　各種農薬との交差反応性

| 農薬 | 商品例 | 交差反応性(%) |
|---|---|---|
| イプロジオン | ロブラール | 100 |
| イプロジオン代謝物 | | 2.1 |
| アセフェート | オルトラン | <0.1 |
| イミノクタジンアルベシル酸塩 | ベルクート | <0.1 |
| 塩化銅 | | <0.1 |
| キャプタン | オーソサイド | <0.1 |
| ジエトフェンカルブ | パウミル | <0.1 |
| ビンクロゾリン | | <0.1 |
| フェンプロパトリン | ロディー | <0.1 |
| ブプロフェジン | アプロード | <0.1 |
| プロシミドン | スミレックス | <0.1 |
| ペルメトリン | アディオン | <0.1 |
| メパニピリム | フルピカ | <0.1 |
| TPN(クロロタロニル) | ダコニール | <0.1 |

## ９．貯法・有効期間

**貯　　法**：遮光して 2～8℃に保存します。
**有効期間**：パッケージの外面に表示してあります。

## １０．注意事項

使用前に、取扱説明書をよくお読みいただき、注意事項をお守りください。

### 1）一般的な注意事項

① 本キットは、食品衛生・環境等に関わる自主検査用です。測定結果の判断と運用は、すべてお客様自身の責任で行ってください。
② 責任ある管理者の指導のもとに、保護手袋、保護メガネ等を着用して安全に取り扱って下さい。
③ 吸飲したり、皮膚と接触したりすると有害な試薬類が含まれています。身体に異常を感じた場合は、直ちに医師の手当てを受けてください。
④ 保管・廃棄する場合には、衛生面、環境面に十分配慮し、法規を遵守してください。イプロジオンを含む廃液、発色反応停止後の液（希硫酸を含む）は回収し、環境中に廃棄しないでください。
⑤ 本キットを一度に使い切らなかった場合は、各容器を密封し、取扱説明書と共に保管してください。

### 2）測定操作上の注意事項

① 本キットは、使用 30 分程前に冷蔵庫から取出し、室温に戻してからご使用ください。
② 異なるロットの試薬を組合わせて使用しないでください。
③ マイクロプレートは、各 8 ウェルづつのストリップタイプになっていますので、必要なウェル数のみを用意し、残りはラミネート袋に戻し、密封して冷蔵保存してください。また、抗体プレートを取扱う際は、裏面を汚さないようにしてください。
④ 正確な分析を行うため、試薬の溶解・希釈操作は可能な限り正確に行ってください。また、各反応時間を厳守してください。
⑤ 検量線は、測定ごとに作成してください。
⑥ 測定は少なくとも 2 重測定で行ってください。
⑦ 測定は、検量線範囲内の濃度（1.5 ～30 ppb）で行って下さい。30 ppb を超える高濃度の測定試料の場合は、10%メタノールで追加希釈した後再測定してください。
⑧ 競合反応後の洗浄ではウェルの底に洗浄溶液が残っていないことを確認して下さい。
⑨ 発色および発色停止反応時の各ウェルの反応時間が一定になるように調整してください。

**株式会社　ホリバ･バイオテクノロジー**
〒601－8315　京都市南区吉祥院車道町 48 番地
TEL.075－692－1786　FAX.075－692－1790
http://www.horiba-biotech.co.jp

## 付録２：開発者による性能試験結果

資料１－１

測定範囲の設定（イプロジオン）

1.　検量線作成及び測定範囲の上限値と下限値の設定
1-1.目的
吸光度がBo（農薬無添加区）の20%～80%に相当する濃度を検量線から読み取り、測定範囲を設定する。

1-2.材料

| |
|---|
| キット用抗体ﾌﾟﾚｰﾄ |
| キット用酵素標識物試薬 |
| 検量線用標準液 |
| 発色液（TMB試薬） |
| 発色停止液（1N 硫酸） |

1-3.方法
1-3-1.抗体プレート
4℃で保管してあるキット用抗体プレートを30分間25℃に静置して使用した。

1-3-2.酵素標識物試液の調製
4℃で保管してあるキット用酵素標識物試薬を30分間25℃に静置した。
↓
蒸留水6 mLで溶解し、酵素標識物試液とした。

1-3-3.検量線溶液の調製
標準品10 mgを10 mLメスフラスコに入れて、メタノールでフィルアップし、1000 ppm標準品メタノール溶液を調製した。
↓
メタノールで段階希釈し、10 ppmの検量線用標準液を調製した。
↓
下表に示すように検量線用標準液を２段階希釈して希釈列を調製した。
↓
4 mLの10%メタノールを添加した試験管に検量線用標準液を各試験管に40 μl添加して、検量線溶液とした。

検量線溶液の調製　　　（2段階希釈）

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 検量線用標準液　(ppm) | 10 | 5 | 2.5 | 1.3 | 0.63 | 0.31 | 0.16 | 0.08 | 0 |
| 希釈後　(ppb) | 100 | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.1 | 1.6 | 0.8 | 0 |

1-3-4.アッセイ
検量線溶液と酵素標識物溶液を等量混合して、混合試液とした。
↓
100 μL/wellで各混合試液を抗体プレートに分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄を３回実施した。
↓
100 μL/wellで発色液を分注した。
↓
発色反応　25℃、10分間静置した。
↓
反応停止　反応停止液100 μL/well分注した。
↓
測定（450 nm）　　　　　　　　　※測定機：スマートリーダー

1-4.結果
（農薬添加区の吸光度）／（農薬無添加区の吸光度）の値（B/Bo）について、B/Bo=0.8付近の
B/Bo=0.8付近の濃度（測定下限；L）として1.5 ppb、及びB/Bo=0.2付近の濃度（測定上限；H)と
して30 ppbを選定して、測定範囲上限および下限に設定した。

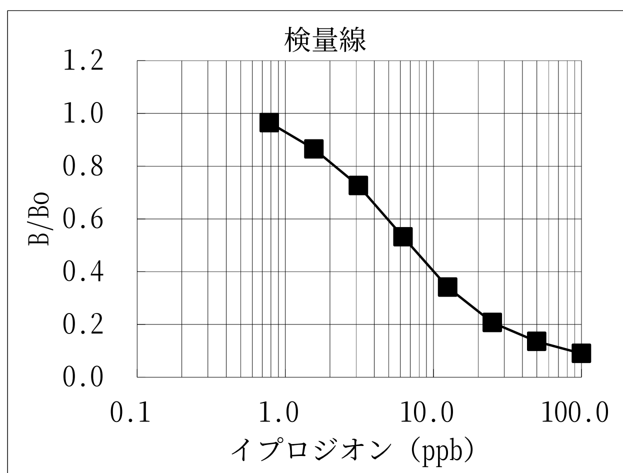



図１．イプロジオン検量線（B/Bo表示）

資料１－２

測定範囲の設定（イプロジオン）

２． 有意差検定
2-1.目的
設定した測定範囲の下限値（L；1.5 ppb）と上限値（H；30 ppb）のBoおよび農薬過剰量の吸光度に対する有意差を確認する。

2-2.材料
イプロジオン測定キット

2-3.方法
2-3-1.キットの調製
4℃保存キットを30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水6 mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。
標準試薬（L, H）に10%メタノール 1.0 mLを添加、溶解して標準試液（L, H）とした。

2-3-2.アッセイ
標準試液（L, H）と酵素標識物溶液、または10%メタノールと酵素標識物溶液を等量混合して、混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100 μL/wellで分注した。
↓
25℃ 1時間静置した。
↓
吸引、洗浄を3回実施した。
↓
発色液を100 μL/wellで分注した。
↓
発色反応 25℃ 10分間静置した。
↓
反応停止 反応停止液100 μL/well分注した。
↓
測定（450nm） ※測定機：スマートリーダー

2-3-3.検定方法
Boの吸光度と標準試液Lの吸光度、及び標準試液Hの吸光度と試薬ブランクの吸光度との間のｔ検定（等分散と仮定した2標本による検定：有意水準＝5%）を実施した。
なお、試薬ブランクは発色液と反応停止液のみを添加したものである。

2-4.結果

表1-1　BoとLとの間の有意差検定

| | Bo | L |
|---|---|---|
| 平均 | 1.5995 | 1.362 |
| 分散 | 0.002825 | 0.000228 |
| 観測数 | 4 | 4 |
| プールされた分散 | 0.0015265 | |
| 仮説平均との差異 | 0 | |
| 自由度 | 6 | |
| t | 8.59666904 | |
| P(T<=t) 片側 | 6.8111E-05 | |
| t 境界値 片側 | 1.94318091 | |
| P(T<=t) 両側 | 0.00013622 | |
| t 境界値 両側 | 2.44691364 | |

表1-2　Hと農薬過剰量との間の有意差検定

| | H | 農薬過剰量 |
|---|---|---|
| 平均 | 0.32225 | 0.13225 |
| 分散 | 0.00022558 | 7.58333E-06 |
| 観測数 | 4 | 4 |
| プールされた分散 | 0.00011658 | |
| 仮説平均との差異 | 0 | |
| 自由度 | 6 | |
| t | 24.8857288 | |
| P(T<=t) 片側 | 1.3854E-07 | |
| t 境界値 片側 | 1.94318091 | |
| P(T<=t) 両側 | 2.7708E-07 | |
| t 境界値 両側 | 2.44691364 | |

BoとLのｔ検定結果
ｔ＞ｔ境界値片側　であり、BoとLとの間には有意差が認められた。

Hと農薬過剰量のｔ検定結果
ｔ＞ｔ境界値片側　であり、Hと農薬過剰量との間には有意差が認められた。

2-5.考察
t検定からBoの吸光度とLの吸光度との間、およびHの吸光度と試薬ブランクの
吸光度との間に有意差があることから、測定範囲の設定の妥当性が確認できた。

資料２

再現性（イプロジオン）

１．目的
キットの再現性（同時、日間）を確認する。

２．材料
イプロジオン測定キット
トマト
1000 ppm　標準品メタノール溶液

３．方法
3-1.添加用標準液の調製
1000 ppm　標準品メタノール溶液
↓
メタノールを用いて下記の表の様に添加用標準液を調製した。

添加用標準液の濃度

| | A | B |
|---|---|---|
| 標準液（ppm） | 22.5 | 9.5 |

3-2.測定試液の調製
農産物試料
↓
磨砕　農産物を細断し、ミキサーでペースト状にした。
↓
ペースト20 ｇを 50 mL遠沈管×2個にそれぞれ正確に量りとった。
↓
添加用標準液をそれぞれ下記の表のように1 mLずつ添加した。
↓

添加用標準液の濃度およびサンプル中の農薬濃度

| 添加試料 | 添加用標準液調製濃度 | ホモジネート中農薬濃度 | 抽出・希釈後濃度 | 添加量 |
|---|---|---|---|---|
| | ppm | ppm | ppb | mL |
| A | 22.5 | 1.1 | 22.1 | 1.0 |
| B | 9.5 | 0.5 | 9.3 | 1.0 |

↓
遠沈管のふたを閉め、よく振った。
↓
メタノール100 mLで洗いこみながら300 mL容三角フラスコに移した。
↓
振とう機（110回/分)で30分間振とうした。
↓
綿球を詰めたシリンジでろ過した。
↓
ろ液を標準品を添加した農産物抽出液(85%MeOH相当）とした。
↓
標準品を添加した農産物抽出液1 mLをﾊﾞｲｱﾙ瓶にとり、7.5 mLの蒸留水を添加し、よく混和した（8.5倍希釈）。これを測定試液とした。

3-3.キットの調製
4℃で保管してあるキット用抗体プレート、酵素標識物試薬および用標準試薬を取り出し、30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水 6 mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。
標準試薬に10%メタノール　1.0 mLを添加、溶解して標準試液とした。

3-4.アッセイ
試験管に酵素標識物試液と測定試液、または酵素標識物試液と標準試液を等量混合し、
混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100 μL/wellで分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄3回実施した。
↓
発色液を100 μL/well分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止　反応停止液100 μL/well分注した。
↓
測定（450nm）　※測定機：スマートリーダー

3-5. 同時再現性
濃度の異なる３試料を各々8点おき、各点ごとに濃度を測定して、値のばらつき具合を確認した。

3-6. 日間再現性
同一測定者が日を変えて3回行った。（8重測定）

４．結果

表2-1　同時再現性

| | 測定値（ppb） | |
|---|---|---|
| | 試料　A | 試料　B |
| 1 | 21.7 | 9.1 |
| 2 | 20.9 | 8.8 |
| 3 | 22.1 | 9.5 |
| 4 | 21.7 | 9.6 |
| 5 | 23.8 | 9.2 |
| 6 | 21.9 | 8.7 |
| 7 | 21.5 | 9.0 |
| 8 | 21.2 | 8.5 |
| 平均 | 21.8 | 9.0 |
| 標準偏差 | 0.9 | 0.4 |
| 変動係数(%) | 4.0 | 4.2 |

表2-2　日間再現性

| | | |
|---|---|---|
| | 試料　A | 試料　B |
| 1日目 | 21.9 | 8.8 |
| 2日目 | 23.7 | 10.0 |
| 3日目 | 20.6 | 9.9 |
| 平均 | 22.1 | 9.5 |
| 標準偏差 | 1.55 | 0.67 |
| 変動係数(%) | 7.0 | 7.1 |

５．考察
トマトのペースト試料にイプロジオンを添加した2試料を用いて、同時再現性および日間再現性を検討した。結果は、それぞれ表2-1および2-2に示す通りで変動係数が各々4.0～4.2及び7.0～7.1%であり、同時再現性および日間再現性は良好であった。

資料３

保存安定性試験（イプロジオン）

１．目的
キットの8℃における保存安定性を確認する。

２．材料
イプロジオン測定キット：2ロット

３．方法
3-1.キットの調製
8℃保存キットを30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水6 mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。
標準試薬に10%メタノール1.0 mLを添加、溶解して標準試液とした。

3-2.アッセイ
試験管に酵素標識物試液と標準試液及び酵素標識物試液と10%メタノールを
等量混合して、混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100 μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄3回実施した。
↓
発色液を100 μL/well分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止　反応停止液100 μL/well分注した。
↓
測定（450nm）　　　　　　　　　測定機：スマートリーダー

４．結果

4-1．1ロット目

表3-1　キットの保存安定性試験（1ロット目）

| | | 保存日数 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | 30 | 90 | 180 | 270 | 360 |
| Bo | 吸光度 | 1.567 | 1.080 | 1.504 | 1.234 | 1.267 | 1.000 |
| | SD | 0.119 | 0.082 | 0.061 | 0.071 | 0.006 | 0.094 |
| | CV(%) | 7.60 | 7.57 | 4.05 | 5.74 | 0.44 | 9.41 |
| | 相対値(%)※ | 100.0 | 68.9 | 96.0 | 78.8 | 80.9 | 63.9 |
| 標準品L | 吸光度 | 1.316 | 1.090 | 1.308 | 1.142 | 1.054 | 0.785 |
| | B/Bo | 0.840 | 1.009 | 0.870 | 0.926 | 0.832 | 0.785 |
| | SD | 0.102 | 0.100 | 0.025 | 0.048 | 0.011 | 0.098 |
| | CV(%) | 7.78 | 9.15 | 1.94 | 4.17 | 1.07 | 12.50 |
| | 相対値(%)※※ | 100.0 | 120.2 | 103.5 | 110.2 | 99.0 | 93.4 |
| 標準品H | 吸光度 | 0.314 | 0.258 | 0.281 | 0.280 | 0.194 | 0.223 |
| | B/Bo | 0.201 | 0.239 | 0.187 | 0.226 | 0.153 | 0.222 |
| | SD | 0.018 | 0.015 | 0.010 | 0.011 | 0.009 | 0.022 |
| | CV(%) | 5.7 | 5.8 | 3.6 | 3.8 | 4.7 | 10.1 |
| | 相対値(%)※※ | 100.0 | 119.1 | 93.1 | 112.9 | 76.1 | 110.9 |
| Boｺﾝﾄﾛｰﾙ | 吸光度 | 1.563 | 1.501 | 1.528 | 1.437 | 1.448 | 1.259 |
| | SD | 0.120 | 0.075 | 0.094 | 0.097 | 0.077 | 0.108 |
| | CV(%) | 7.7 | 5.0 | 6.2 | 6.7 | 5.3 | 8.6 |
| | 相対値(%)※ | 100.0 | 96.0 | 97.8 | 91.9 | 92.6 | 80.6 |

4-2．2ロット目

表3-2　キットの保存安定性試験（2ロット目）

| | | 保存日数 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | 30 | 90 | 180 | 270 | 360 |
| Bo | 吸光度 | 1.665 | 1.583 | 1.556 | 1.475 | 1.319 | 1.193 |
| | SD | 0.036 | 0.048 | 0.072 | 0.041 | 0.011 | 0.027 |
| | CV(%) | 2.2 | 3.1 | 4.6 | 2.8 | 0.8 | 2.3 |
| | 相対値(%)※ | 100.0 | 95.1 | 93.5 | 88.6 | 79.2 | 71.7 |
| 標準品L | 吸光度 | 1.323 | 1.385 | 1.364 | 1.279 | 1.093 | 1.022 |
| | B/Bo | 0.795 | 0.874 | 0.877 | 0.867 | 0.828 | 0.857 |
| | SD | 0.082 | 0.048 | 0.061 | 0.027 | 0.036 | 0.073 |
| | CV(%) | 6.2 | 3.5 | 4.5 | 2.1 | 3.3 | 7.1 |
| | 相対値(%)※※ | 100.0 | 110.1 | 110.4 | 109.1 | 104.3 | 107.8 |
| 標準品H | 吸光度 | 0.314 | 0.307 | 0.302 | 0.326 | 0.218 | 0.256 |
| | B/Bo | 0.188 | 0.194 | 0.194 | 0.221 | 0.165 | 0.214 |
| | SD | 0.004 | 0.005 | 0.010 | 0.005 | 0.014 | 0.028 |
| | CV(%) | 1.4 | 1.6 | 3.3 | 1.5 | 6.4 | 10.9 |
| | 相対値(%)※※ | 100.0 | 102.9 | 102.8 | 117.1 | 87.5 | 113.8 |
| Boｺﾝﾄﾛｰﾙ | 吸光度 | 1.550 | 1.453 | 1.720 | 1.557 | 1.512 | 1.461 |
| | SD | 0.075 | 0.120 | 0.137 | 0.018 | 0.015 | 0.196 |
| | CV(%) | 4.8 | 8.2 | 7.9 | 1.1 | 1.0 | 13.4 |
| | 相対値(%)※ | 100.0 | 93.8 | 111.0 | 100.5 | 97.6 | 94.3 |

※　0日目の吸光度を基準とした相対値
※※　0日目のB/Boを基準とした相対値

５．考察
2ロットの保存安定性試験を実施した結果、2ロットともに360日でBo値の大きな低下が認められたことから、270日目までを測定可能期間と判断し、本キットは安全性を考慮して7ヶ月（安定期間×0.85）を使用期間とした。

資料　4

交差反応性（イプロジオン）

１．目的
本キットの、類似構造農薬及び代表的農薬の交差反応性を確認した。
２．材料
イプロジオン測定キット（標準試薬は除く）

対象農薬の標準品

| | |
|---|---|
| 1 | イプロジオン |
| 2 | イプロジオン代謝物 |
| 3 | ビンクロゾリン |
| 4 | プロシミドン |
| 5 | クロルタロニル（TPN） |
| 6 | イミノクタジンアルベシル酸塩 |
| 7 | キャプタン |
| 8 | フェンプロパトリン |
| 9 | アセフェート |
| 10 | ブプロフェジン |
| 11 | メパニピリム |
| 12 | ペルメトリン |
| 13 | ジエトフェンカルブ |

３．方法
3-1.交差反応性測定用試液の調製
標準品をメタノールで溶解して段階希釈し希釈列を調製した。
試験管に4 mLの10%メタノールをとり、希釈列を各試験管に40 μL添加して、
交差反応性測定用試液とした。

3-2.キットの調製
4℃保存キットを30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水6 mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。

3-3.アッセイ
試験管に酵素標識物試液と交差反応性測定用試液を等量混合し、混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100 μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄3回実施した。
↓
発色液を100 μL/wellで分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止　　反応停止液100 μL/wellで分注した。
↓
測定（450nm）　　※測定機：スマートリーダー

3-4. 交差反応性の算出
測定結果から$IC_{50}$値を求めたのち、交差反応性を算出した。
計算式は以下のとおりである。

交差反応性（%）＝$IC_{50}$値（イプロジオン）／$IC_{50}$値（対象農薬）×100

４.結果

表4　交差反応性一覧

| 農薬 | 交差反応性(%) |
|---|---|
| イプロジオン | 100 |
| イプロジオン代謝物 | 2.1 |
| ビンクロゾリン | <0.1 |
| プロシミドン | <0.1 |
| クロルタロニル（TPN） | <0.1 |
| イミノクタジンアルベシル酸塩 | <0.1 |
| キャプタン | <0.1 |
| フェンプロパトリン | <0.1 |
| アセフェート | <0.1 |
| ブプロフェジン | <0.1 |
| メパニピリム | <0.1 |
| ペルメトリン | <0.1 |
| ジエトフェンカルブ | <0.1 |

５．考察

各種農薬に対する本キットの交差反応性は、表3に示す通りで、対象農薬のうちイプロジオン代謝物が2.1%である以外は交差反応性は認めなかった。

資料　5

添加回収試験（イプロジオン）

１．目的
農産物に添加したイプロジオンの回収率を確認する。

２．材料
イプロジオン測定キット
トマト
1000 ppm　標準品メタノール溶液

３．方法
3-1.添加用標準液の調製
1000 ppm　標準品メタノール溶液
↓
メタノールを用いて下記の表の様に添加用標準液を調製した。

添加用標準液の濃度

| | A | B | C |
|---|---|---|---|
| 標準液（ppn） | 30 | 15 | 4 |

3-2.測定試液の調製
農産物試料
↓
磨砕：農産物を細断し、ミキサーでペースト状にした。
↓
ペースト20 ｇを 50 mL遠沈管×3個にそれぞれ正確に量りとった。
↓
添加用標準液をそれぞれ下記の表のように1 mLずつ添加した。

↓

添加用標準液の濃度およびサンプル中の農薬濃度

| 添加試料 | 添加用標準液調製濃度 | ホモジネート中農薬濃度 | 抽出・希釈後濃度 | 添加量 |
|---|---|---|---|---|
| | ppm | ppm | ppb | mL |
| A | 30 | 1.5 | 30 | 1.0 |
| B | 15 | 0.8 | 15 | 1.0 |
| C | 4 | 0.2 | 4 | 1.0 |

↓
遠沈管のふたを閉め、よく振った。
↓
メタノール100 mLを洗いこみながら、300 mL容三角フラスコに移した。
↓
振とう機（110回/分)で30分間振とうした。
↓
綿球を詰めたシリンジでろ過した。
ろ液を標準品を添加した農産物抽出液(85%MeOH相当）とした。
↓
標準品を添加した農産物抽出液1 mLをﾊﾞｲｱﾙ瓶にとり、7.5 mLの蒸留水を添加し、
よく混和した。（8.5倍希釈）これを測定試液とした。

3-3.キットの調製
4℃で保管してある抗体プレート、酵素標識物試薬、
標準試薬を取り出し、30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水6 mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。
標準試薬に10%メタノール　1.0 mLを添加、溶解して標準試液とした。

3-4.アッセイ
試験管に酵素標識物試液と測定試液、酵素標識物試液と標準試液及び酵素標識物試液と10%MeOHを等量混合して、混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100 μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄3回実施した。
↓
発色液を100 μL/wellで分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止　　反応停止液100 μL/wellで分注した。
↓
測定（450nm）　　　　　　　　測定機：スマートリーダー

## ４．結果

表5　添加回収試験

| 添加濃度　(ppm) | 回収濃度(ppm) | 回収率（%） | 平均回収率（%） |
|---|---|---|---|
| 4.00 | 3.35 | 83.8 | 89.7 ± 5.5 |
| | 3.62 | 90.5 | |
| | 3.79 | 94.6 | |
| 15.00 | 13.17 | 87.8 | 91.4 ± 3.1 |
| | 14.00 | 93.3 | |
| | 13.94 | 92.9 | |
| 30.00 | 24.38 | 81.3 | 87.1 ± 5.1 |
| | 27.15 | 90.5 | |
| | 26.91 | 89.7 | |

## ５．考察
トマトのペーストにイプロジオンを添加した試料について、添加回収試験を行った。結果は表4のとおり。
回収率は87.1～91.4%と良好な値を示した。なお、回収率の計算は、下記のとおりである。・
回収率（%）＝（添加試料の回収濃度）／（添加濃度）×100

付録３：参考となるその他の文書やデータ等

【1】技術の先進性について

特開平１１－１４７８７８「イプロジオン及びその代謝物のハプテン化合物、抗体および測定方法」

【2】その他（特記すべき事項）

イプロジオンは「水道法水質管理目標設定項目の対象（目標値 0.3 mg/L 以下）」、「公共用水等における農薬の水質評価指針値（0.3 mg/L 以下）」や「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針値（3 mg/L 以下）」が定められており、環境水での適応を確認するため申請するものです。

付録４－１

# 品質管理マニュアルＥＬＩＳＡ法（イプロジオン）

## 目次

## １　機器・器具保守管理標準作業手順

使用する機器・器具類は、以下の管理番号を付し、保守管理標準作業手順（SOP）に従って保守管理を行う。

| 機械・機具類 | SOP．No | 管理番号 |
|---|---|---|
| マイクロプレートリーダー（TECAN 社製サンライズリモート） | SOP-1 | SOP-1-1 |
| マイクロプレートウォッシャー（TECAN 社製　ｺﾛﾝﾊﾞｽｳｫｯｼｬｰ） | SOP-2 | SOP-2-1 |
| マイクロピペット（2-20μL）（エッペンドルフ社製） | SOP-3 | SOP-3-1 |
| マイクロピペット（20-200μL）（エッペンドルフ社製） | SOP-3 | SOP-3-2 |
| マイクロピペット（100-1000μL）（エッペンドルフ社製） | SOP-3 | SOP-3-3 |
| マルチチャンネルマイクロピペット（エッペンドルフ社製） | SOP-3 | SOP-3-4 |
| 冷蔵庫（ナショナル NR-B43A-W） | SOP-4 | SOP-4-1 |

## １－１　マイクロプレートリーダー保守管理標準作業手順（SOP-1）

　マイクロプレートリーダーは、定期的な校正を行って適正な測定精度が担保されたものを使用する。

通常の使用にあたっては、以下の使用時点検を実施し、正常であることを確認した後使用する。

（1）使用時点検マニュアル

使用者は使用時点検マニュアルに従って点検し、使用時点検記録簿（様式１）に記入する。

【使用時点検マニュアル】

| 点検項目 | 点検方法 | 管理基準等 | 処置等 |
|---|---|---|---|
| ①外観・プレート設置台 | 目視により外観・プレート設置台の汚れ・ほこりがないことを確認する | 外観・プレート台に汚れ・ほこりがないこと | 清掃 |
| ②光源ランプ | 光源ランプの光量は十分か | 光源ランプの光量（立ち上げ時自動診断） | 修理・交換 |
| ③フィルター | フィルターの劣化はないか | フィルターの劣化がないこと（立ち上げ時自動診断） | 修理・交換 |

【使用時点検記録簿記入方法】

判定には、良好を〇、不良を×と記入する。

不良の場合は正常な状態になるように処置し、処置内容を記す。

（2）定期点検マニュアル

　定期的に点検を業者に依頼し、機器の校正を行う。

【定期点検記録簿記入方法】

業者の点検項目・修理箇所を記録簿（様式２）に記入する。

バリデーション結果報告書は、記録簿とともに保存する。

## １－２　マイクロプレートウォッシャー標準保守管理作業書（SOP-2）

　使用にあたっては、以下の使用時点検を実施し、正常であることを確認した後使用する。

（1）使用時点検マニュアル

使用者は使用時点検マニュアルに従って点検し、使用時点検記録簿（様式１）に記入する。

【使用時点検マニュアル】

| 点検項目 | 点　検　方　法 | 管理基準等 | 処置等 |
|---|---|---|---|
| ①外観・プレート設置台 | 目視で損傷・汚れがないことを確認する | 目視で損傷・汚れがないこと | 清掃 |
| ②配管 | 配管チューブ・ノズルに塩類の結晶等の詰まり・汚れがないか<br><br>配管チューブからの液漏れはないか | 結晶等の詰まり・汚れがないこと<br><br>液漏れがないこと | 洗浄・交換<br><br>修理・交換 |
| ③動作確認 | 空のマイクロプレートを設置して動作確認をする | 洗浄液がウェルに均等に分注されること | 点検修理 |

【使用時点検記録簿記入方法】

判定には、良好を○、不良を×と記入する。

不良の場合は正常な状態になるように処置し、処置内容を記す。

（2）定期点検マニュアル

　定期的に業者による点検を受ける。

　【定期点検記録簿記入方法】

　業者の報告書により点検項目・修理箇所を記録簿（様式２）に記入する。

　バリデーション結果報告書は、記録簿とともに保存する。

## １－３　マイクロピペット標準保守管理作業書（SOP-3）

マイクロピペットは、定期的に校正を行って適正な測定精度が担保されているものを使用する。

通常の使用にあたっては、以下の使用時点検を実施し、正常であることを確認した後使用する。

（１）使用時点検マニュアル

使用者は、使用時点検マニュアルに従って点検し、使用時点検記録簿に記入する。

【使用時点検マニュアル】

| 点検項目 | 点　検　方　法 | 管理基準等 | 処置等 |
|---|---|---|---|
| ①外観 | ノーズコーンに汚れ、詰まりはないか | 汚れ・詰まりがないこと | 清掃 |
| ②ピストンの動き | ピストンの動きはスムーズか | ピストンの動きはスムーズであること | ピストンの清掃及びグリースの塗布 |
| ③チップからの液漏れ | チップからの液漏れはないか | チップからの液漏れがないこと | ピストンとピストンシールの点検・交換 |

【使用時点検記録簿記入方法】

判定には、良好を〇、不良を×と記入する。

不良の場合は正常な状態になるように処置し、処置内容を記す。

（２）定期点検マニュアル

定期的にバリデーションをうける。

【定期点検記録簿記入方法】

定期点検簿（様式３）に記入するとともにバリデーション証明書を保存する。

## １－４　冷蔵庫の標準保守管理作業書（SOP-4）

（1）使用時点検マニュアル

使用者は使用時点検マニュアルに従って点検し、使用時点検記録簿に記入する。

【使用時点検マニュアル】

| 点検項目 | 点検方法 | 管理基準等 | 処置等 |
|---|---|---|---|
| ①外観・庫内の汚れ | 目視により損傷・汚れはないか | 目視により損傷汚れがないことを確認する | 汚染→清掃<br>損傷→修理 |
| ②温度表示 | 目視と温度測定<br>（温度測定装置） | 設定温度と表示温度が±2.5℃以内であること | 不良の場合は調整、修理を依頼する |
| ③扉 | 開閉を行う | 完全に開閉でき、異物等により妨げられていないこと | 異物等を取り除く |

【使用時点検記録簿記入方法】

判定には、良好を〇、不良を×と記入する。

不良の場合は正常な状態になるように処置し、処置内容を記す。

## 機器・器具等使用時点検記録簿（様式１）

　　　年　月　日

マイクロプレートリーダー　　　管理番号　SOP-1-1　　　機種・形式

- □　外観に汚れがない
- □　プレート台に汚れ・ほこりがない
- □　光源ランプの光量不足がない（自己診断）
- □　フィルターの劣化がない（自己診断）

| 不良箇所の処置内容 |
|---|
| |

点検者

マイクロプレートウォッシャー　管理番号　SOP-2-1　　　機種・形式

- □　目視で汚れ・損傷がない
- □　配管チューブ・ノズルに詰まり・汚れがない
- □　配管チューブからの液漏れがない
- □　空プレートによる動作確認

| 不良箇所の処置内容 |
|---|
| |

点検者

マイクロピペット

| | |
|---|---|
| 管理番号　SOP-3-1 | □　ノーズコーンに汚れ・詰まりがない |
| （2-20μL） | □　ピストンの動きはスムーズか |
| | □　チップからの液漏れがない |
| 管理番号　SOP-3-2 | □　ノーズコーンに汚れ・詰まりがない |
| （20-200μL） | □　ピストンの動きはスムーズか |
| | □　チップからの液漏れがない |
| 管理番号　SOP-3-3 | □　ノーズコーンに汚れ・詰まりがない |
| （100-1000μL） | □　ピストンの動きはスムーズか |
| | □　チップからの液漏れがない |
| 管理番号　SOP-3-4 | □　ノーズコーンに汚れ・詰まりがない |
| （30-300μL） | □　ピストンの動きはスムーズか |
| | □　チップからの液漏れがない |

| 不良箇所の処置内容 |
|---|
| |

点検者

冷蔵庫　　　　　　　　　　管理番号

機種・形式

- □ 外観・庫内の汚れはないか
- □ ファンの作動は正常か
- □ 温度表示は設定範囲内か
- □ 扉の開閉は正常か

| 不良箇所の処置内容 |
|---|
| |

点検者

冷蔵庫　　　　　　　　　　管理番号

機種・形式

- □ 外観・庫内の汚れはないか
- □ ファンの作動は正常か
- □ 温度表示は設定範囲内か
- □ 扉の開閉は正常か

| 不良箇所の処置内容 |
|---|
| |

点検者

**機器・器具等定期点検記録簿（様式２）**

管理番号：

機種・形式：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿　管理担当者＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

| 点検年月日 | 点検事項 |
|---|---|
| | 点検者：<br>確認者： |
| | 点検者：<br>確認者： |
| | 点検者：<br>確認者： |

（注）点検報告書及び校正証明書を綴じ込んで保存すること。

## ２　マイクロプレートリーダーの標準操作手順

### ２－１　分析システム

対象化学物質の測定には、以下の ELISA 測定システムを使用する。

---

マイクロプレートリーダー：　サンライズリモート
（TECAN 社製）
解析ソフトウェアー：　LS-PLATEmanager 2004
（和光純薬（株）製）

### ２－２　マイクロプレートリーダーの操作

本体起動
↓
LS-PLATEmanager 起動
↓
ファイルの新規作成
↓
測定パラメータの設定
↓
検体の配置
↓
測定開始（マイクロプレートをセット）
↓
測定終了
↓
レポート印刷
↓
データに名前を付けて保存

## ３　試験操作手順

### ３－１　一般的な事項

（1）試験室の管理

・室温は、試験品の取扱説明書の指示に従って管理する。

・試料の前処理を行う室は、試験品の測定を行う室とは別の室で行う。

（2）試験方法

・試験品の取扱説明書の試験方法を習熟し、取扱説明書指定の方法を厳守する。

・取扱説明書の特記事項には、十分注意して操作する。

（3）試験時の注意

ア．試験品の有効期限

・有効期限には十分注意し、有効期限を過ぎたものは使用しない。

イ．試薬温度の管理

・保管していた温度から室温に戻すときは、確実に室温に戻っていることを確認する。

・試薬の温度管理は、取扱説明書の指示に従って管理する。

ウ．マイクロピペットの取扱い

・チップは確実に取り付ける。

・マイクロピペットの取扱いは慎重に行い、試料の持ち越しがないように十分注意する。

・試料を替える際は、試料毎に確実にチップを交換する。

エ．汚染防止措置

・汚染を防止するために、ディスポーザブル・グローブを使用する。

・グローブは、高濃度の標準溶液（原液）を取り扱った時又は汚染の可能性があるときは、必ず新しいグローブに替えて次の操作に移る。

エ．反応時間の厳守

・反応時間・発色時間は、取扱説明書の時間を厳守し、試料によってばらつきが生じないよう、ストップウォッチ等を用いて計測する。

・反応溶液と反応停止溶液を加えるときは、加えるウェルの順番を同じにし、作業手順を一定にする。

オ．標準液の取扱い

・標準溶液系列を取り扱う時は、低濃度域から順次取り扱う。

カ．分析作業台帳

・分析作業にあたっては、分析作業台帳（様式３）により、分析条件及び標準溶液・分析試料の数及び配置を記録・管理する。

キ．その他

・異なるキットの試薬を組み合わせて使用しない。

**分　析　作　業　台　帳（様式３）**

分析作業名：________________________________________________

実施者：_______________

____年____月____日　開始時刻________　室温______　、終了時刻________　室温______

使用機器等（管理番号を記入する）

マイクロプレートリーダー：__________、　プレートウォッシャー：__________

マイクロピペット：__________、__________、__________、__________、__________、

冷蔵庫：__________

使用した ELISA キット・試薬

識別 No：__________、ELISA キット名：____________　Lot.No.:____________

サンプル

配置図

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

## ３－２　試験標準作業書

（ELISA キットによって、使用する試薬、器具並びに装置は異なっている。市販キットの１例について示す。）

イプロジオン

１　試薬

メタノール　残留農薬試験用（和光純薬工業）

イプロジオン標準品（和光純薬工業）

試薬（キット）

２　器具及び装置

（1）マイクロピペット及びチップ

設定した容量を精度良く分取できるもの。

（2）マルチチャンネルピペット（300μL）

設定した容量を精度良く分取できるもの。

（3）試薬リザーバー

（4）ディスポーザブルガラス試験管

（5）マイクロプレートシール

（6）混合用マイクロプレート

（7）ディスプーザブル滅菌シャーレ

（8）SPC 栓ガラス瓶（100mL、250mL）

（9）ペーパータオル

（10）マイクロプレートウォッシャー

96 ウェルマイクロプレートの各ウェルの洗浄ができるもの。

（11）マイクロプレートリーダー

96 ウェルマイクロプレートの各ウェルの吸光度を測定できるもの。

（12）データ解析用コンピューター及び解析ソフトウェア

検量線の回帰式（４パラメーター、多項式等）の作成及び試料の濃度を算出できるもの。

３　操作

フローチャート　　測定時間約 3 時間（試薬を室温に戻す時間含む）

定量範囲：1.5－30μg／L

①準備　　試験用プレート及び試薬類を室温に戻す

↓

②ｲﾌﾟﾛｼﾞｵﾝ標準液の調製　　添付のイプロジオン標準原液を希釈し、10%メタノール溶液で標準液を調製する

↓

調製濃度：5 系列（30, 9.0, 4.5, 1.5, 0μg／L）

| | |
|---|---|
| ③混合液の調製 | 試料溶液またはイプロジオン標準液 60μL と酵素標識物試薬 60μL を混合用マイクロプレートで混合 |
| ↓ | |
| ④抗原抗体反応 | 抗体固相化プレートに④で調製した混合液 100μL を加え、室温（15～25℃）で 60 分間反応 |
| ↓ | |
| ⑤洗浄液の調製・洗浄 | 濃縮洗浄液を精製水で 10 倍に希釈する（最終液量：500mL）<br>洗浄液 300μL でウェルを 3 回洗浄する<br>洗浄後はペーパータオル上で充分水分を除去する。 |
| ↓ | |
| ⑥発色反応 | 発色試薬 100μL をウェルに加え、室温（15～25℃）で 10 分間反応させる |
| ↓ | |
| ⑦反応停止 | 反応停止液 100μL をウェルに加える |
| ↓ | |
| ⑧比色・濃度計算 | マイクロプレートリーダーを用い、波長 450nm で吸光度を測定し、標準曲線から試料中の濃度を計算 |

（解析ソフトは使用説明書に従う）

注意事項：取扱説明書の特記事項を遵守する。

付録４－２

# 品　質　管　理　マ　ニ　ュ　ア　ル

# 機器分析法（イプロジオン）

はじめに

　機器分析は、一般環境における試料採取、運搬、保存処理、機器分析のための抽出、濃縮、精製等の前処理、測定機器の調整、標準試料測定、試料測定、データ処理及び結果報告までの一連の作業、操作から成っており、これらについて表１に示す手法により、分析精度管理を実施する。

## １．一般的規定（その１）

水質試料の採取、運搬及び調製に係る一般的な考え方、手順、方法について示す。これらに留意し、適切な地点と時期を選定し、代表性のある試料採取を行い、調査媒体と測定対象物質に変質がないように運搬、調製する。

### １－１　試料採取地点の選定

試料採取にあたっては、特定の発生源の影響を受けない一般的な環境を対象として地点を選定する。この際、測定結果を評価する上で参考となる水文、気象、土地利用等のデータが利用できる地点があれば、それを優先する。

### １－２　水質試料採取

（１）採水時期

原則として、比較的晴天が続き、水質が安定している日を選定する。感潮域の場合には、海水の影響の少ない干潮時を採水時間帯とする。

（２）採水部位

表層水の採取を基本とし、河川では原則として流心で採水する。表層は水深の１／５程度までの層であり、通常、水面下０～数１０ｃmを採取する。水深がごく浅い地点においては底泥の巻き上げによる混入がないよう注意深く採水する。また、水面に浮遊ごみや浮遊油脂類が目視される場合には、これらが混入しないように、０～２ｃm層を避けて採水する。

（３）採水器具

採水器具は、地点の状況に応じ、バケツ、柄付きの採水器（ひしゃく）、ハイロート採水器、バンドーン採水器を用いる。器具の材質としては、ステンレス製、合成樹脂製があるが、測定対象物質や測定を妨害する物質が溶出しない材質で、かつ、測定対象物質が内壁に付着しにくい材質のものを使用する。

当実証事業では、測定対象物質が有機物質であるため、採水器具は合成樹脂製でないステンレス製のバケツまたはひしゃくを使用する。採水器具は事前に洗剤で洗浄後、十分に水道水で水洗しておく。また、バケツにつけるロープは麻製のものを使用する。

なお、現地で採取する水面に容易に近づける場合は、試料容器を素手で持ち、直接、試料水を採取する。

（４）試料容器

試料容器は、運搬・保管時の汚染や損失がないようなものを、測定対象物質ごとに準備する。

当実証事業では、容量４Ｌで四フッ化エチレン樹脂フィルムで密閉できる褐色のガラス製ネジ口瓶を使用する。容器は使用の当日までに水洗、乾燥を済ませ、清浄な保管庫に保管しておいたものを、当日、残留農薬測定用のアセトン及びヘキサンで洗浄し、乾燥させたのち、密栓したものを使用する。

なお、一般項目測定用の試料容器はポリエチレン製の容器で、事前に水道水で水

洗後、精製水でゆすいだものを使用する。

（５）採水操作

採取場所の状況から、測定対象物質に適した採水器具、または試料容器そのものを用いて表層水を採取する。採水器具は、表層水で３回共洗いした後、採水し、試料とする表層水を試料容器に移し入れ、満水にして密栓する。

なお、試料容器の内壁への吸着が想定される疎水性有機物質（水溶解度：１ｍｇ／Ｌ以下）等が測定対象となる場合には、試料容器の共洗いは行わない。

測定対象物質の安定化のために、還元剤や酸の添加、あるいはサロゲート標準物質の添加が必要な場合には、各物質の分析に係る標準作業手順（ＳＯＰ）に従って、適切に処理する。農薬を測定対象とする試料については、残留塩素が存在する場合、残留塩素１ｍｇ当たりＬ(+)－アスコルビン酸溶液(40 g/L) 0.1 ｍｌの割合で添加する。採水操作に併せて、水温、気温、外観、色相、臭気、夾雑物、油膜の有無等の水質に係る基本事項を記録する。

## １－３　運搬・保存方法

採取した試料は、汚染のない適切な運搬容器に入れて、遮光・保冷状態で試験施設まで運搬する。

試験施設に到着後、できるだけ速やかに試料の調製を行い、分析に供する。やむを得ず保存が必要な場合は、試料を汚染することのない冷暗所（４℃以下）で保存する。

## １－４　試料調製

水質試料は、原則として懸濁物質を含む試料を分析する。

## １－５　野外及び試料に関するデータの記録

試料採取の際には野外データを、試験施設に搬入時には試料データを測定し、表２の「現地調査（試料採取）記録表」に記録する。

（１）野外データ

試料採取の際には、野帳に次の野外データを記録する。

・採取日時、採取担当者名
・採取地点の名称、正確な位置（地図）、一般環境状態、周辺施設（略図）
・気象条件（気温、天候）
・外観（濁り、臭気、色相、夾雑物）
・現場測定を行った項目の結果（水温、ｐＨなど）
・試料の安定化処理の方法
・運搬・保存の条件

（２）試料データ（一般項目）

試料の一般的性状を示す試料データは、測定の目的に応じて分析結果の評価に必要となる項目について、試験施設に持ち帰った直後またはできるだけ速やかに、ポリエチレン製容器の試料を用いて測定し、記録する。

表１　試料採取から分析結果報告までのフローと品質管理

| 段階 | 事項 | 主な精度管理の方法 | 品質管理のための書面による記録 |
|---|---|---|---|
| 事前準備及び試料採取 | 試料採取地点の選定 | 一般的規定（その１）に従い実施 | 現地調査記録表 |
| | 試料採取時期 | | |
| | 試料採取部位 | | |
| | 採取器具の準備 | | |
| | 容器の準備 | | |
| | 試料採取操作 | | |
| | 運搬・保存方法 | | |
| | 野外データの記録 | | |
| | 試料データ（一般項目）の記録 | | |
| 試料の前処理 | 分析用試薬及び器具の準備 | ＳＯＰに従い実施 | 標準物質（標準溶液）記録表　分析精度管理総括表 |
| | 標準溶液の調製 | | |
| | サロゲート溶液の調製 | | |
| | クリーンアップ・スパイクの調製 | | |
| | シリンジ・スパイクの調製 | | |
| | サロゲート溶液添加 | | |
| | クリーンアップ・スパイクの添加 | | |
| | 抽出操作 | | |
| | クリーンアップ操作 | | |
| | 濃縮操作 | | |
| | シリンジ・スパイクの添加 | | |
| ＧＣ／ＭＳ測定 | ＧＣ／ＭＳの最適化 | 一般的規定（その２）及びＳＯＰに従い実施 | 装置検出下限値(IDL)の算定記録表<br>検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)の算定記録表<br>分析精度管理総括表 |
| | 測定条件の検討 | | |
| | 検量線の作成 | | |
| | ＩＤＬ | | |
| | ＭＤＬ | | |
| | 定量下限値 | | |
| | 空試験 | | |
| | 添加回収試験 | | |
| | 二重測定による試料測定 | | |
| | トラベルブランク測定 | | |
| | 操作ブランク測定 | | |
| 分析結果 | データ処理 | ＳＯＰに従い実施 | 分析精度管理総括表 |
| | 定量計算 | | |
| | 分析結果報告 | | |
| | 品質管理報告 | 品質管理報告書 | |

表２　現地調査（試料採取）記録表

| | | | |
|---|---|---|---|
| 分析対象物質名 | | | |
| 採取日時 | | 年　月　日（　時　分～　時　分） | |
| 採水河川名等 | | | |
| 採取地点名 | | | |
| 採水部位 | | 表層　・　その他（　　　　　） | |
| 採水担当者名 | | | |
| 採水担当者所属 | | | |
| 採水器具 | | バケツ・ヒシャク・バンドーン採水器・試料容器直接・その他（　　　　） | |
| 採取器具の材質 | | ステンレス・プラスチック・その他（　　　　） | |
| 試料容器 | | 褐色ガラス試薬瓶（容量　　L） | |
| 試料容器本数 | | 分析用（　　　本）・予備（　　　本）・トラベルブランク用（　　　本） | |
| 共洗い操作 | | 有り（　　回）・　無し | |
| 安定化処理の有無 | | 有り　・　無し | |
| 安定化処理操作 | | 添加物質名（　　　　　　）添加量（　　　　　g） | |
| トラベルブランク操作 | | 有り　・　無し | |
| 一般項目用試料容器 | | ポリ瓶（容量　　L）×（　　　本） | |
| 天候 | | | |
| 気温 | | （　　　　℃） | |
| 水温 | | （　　　　℃） | |
| 水深 | | （　　　　m） | |
| 流速 | | | |
| 外観 | 濁り | | （現場略図） |
| | 臭気 | | |
| | 色相 | | |
| | 夾雑物 | | |
| | 油膜の有無 | 有り　・　無し | |
| 現場測定 | ｐＨ | | |
| | ＤＯ | | |
| | 残留塩素 | | |
| 水質 | ＳＳ | | |
| | ＢＯＤ | | |
| | ＣＯＤ | | |
| 試料運搬方法 | | | |
| 試料運搬時の保存方法 | | クーラーボックス（氷冷）<br>その他（　　　　　　） | |
| 試料搬入時刻 | | （　　時　　　分） | |
| 分析までの保管方法 | | 試料庫（　　　℃）　　　　　その他（　　　　　　） | |
| 現場記録 | 略図 | 有り　・　無し | |
| | 周辺写真 | 有り　・　無し | |
| 現場情報 | 地形図 | 有り　・　無し | |
| | 潮汐表 | 有り　・　無し | |

## ２．一般的規定（その２）

測定データの品質を維持するため、使用する器具類、試薬類等を適切に管理し、細心の注意をはらって使用することにより、操作ブランクを可能な限り低減させるよう配慮する。また、測定機器を適正に維持管理し、性能評価を行った上で、測定条件を決定し、再現性のある測定を確保する。

### ２－１　前処理操作と機器測定

（１）標準溶液

測定値は、採取試料と標準物質の分析結果を比較することにより得られるが、その結果の信頼性を確保するため、可能な限りトレーサビリティーの保証された標準物質を使用する。これらの標準物質、標準溶液については、メーカー名、規格、容量、ＬＯＴ番号、有効期限、開封年月日、使用の経歴、使用者名を表３の「標準物質（標準溶液）記録表」に記録しておく。

標準物質の保存方法は、メーカー指定の条件により行い、標準溶液の調製方法、調製した標準溶液の保存方法は各物質の分析に係る標準作業手順（ＳＯＰ）に従う。

（２）前処理操作

試料を分析するに際して、抽出、精製、濃縮等の適切な前処理操作が必要であり、これらの操作の出来不出来が分析結果に大きく影響するので、予め、各物質の分析に係る標準作業手順（ＳＯＰ）に記載された添加回収試験液を用いて試験を行い、回収率とその再現性を確認しておく。

添加回収試験における許容限度は回収率で８０～１２０％、サロゲート標準物質の回収率で５０～１２０％とし、これを逸脱している場合はその原因を究明し、許容限度内に収まるように前処理操作の改善を行う。

また、操作ブランクの有無と程度を確認し、有の場合には、それが極力小さくなるように前処理操作の改善を行う。

（３）分析装置の最適化

使用する分析機器は、試料の測定が可能になるよう測定条件を設定し、調整しておく。この際、感度とその直線性、安定性等の他、測定の誤差となる干渉の有無や大きさ、その補正機能等について、信頼できる分析が可能かどうか確認しておく。

分析機器の最適化及び測定条件は、各物質の分析に係る標準作業手順（ＳＯＰ）に従い設定する。

分析機器の感度は装置検出下限値（ＩＤＬ；Instrument Detection Limit）で評価する。検量線作成用標準液の最低濃度のもの、または、シグナル／ノイズ（Ｓ／Ｎ）比で５～１５程度の濃度の標準液を５回以上（通常７回とする）繰り返して測定し、得られた測定値から標準偏差を求め、ＩＤＬを算定する。

さらに、試料量、最終前処理液量、分析装置導入量等から、ＩＤＬの試料換算値を求め、この値が目標とする検出下限値以下であることを確認する。

ＩＤＬ算定は以下に示す手順により行い、結果を表４の「装置検出下限値（ＩＤＬ）の算定記録表」に記録する。

なお、測定データ等ＩＤＬ算定に係るデータはすべて記録、保管しておく。

・ 水質における装置検出限界（ＩＤＬ）の算定手順

Step-1　装置の最適化

測定装置（分析システム）を対象物質の分析に最も適した条件に設定及び調整する。

<設定及び調整項目の例>

ＭＳのチューニング、カラム条件、昇温条件、注入口圧力等各物質の分析に係る標準作業手順に従い設定及び調整する。

Step-2　検量線の作成

検量線を以下の手順で作成する。

<検量線作成の例>

１μg/ml 標準溶液を作成し、内標準添加→測定→ピーク検出→５～１０倍に標準溶液を希釈し、内標準添加→測定→ピーク検出→５～１０倍に標準溶液を希釈し、内標準添加→測定→　の順に操作を繰り返す。ピークが観察できなくなるか（Ｓ／N比＜５）、または、対象物質を添加していない溶液（検量線ブランク溶液）とピーク強度（ピーク比）が等しくなった時点で操作を終了する。ピーク比を縦軸、注入量又は濃度を横軸にプロットして、検量線を作成する。

Step-3　繰り返し試験用標準溶液の作成

Step-2 で測定したクロマトグラムを参考にして、Ｓ／N比５～１５（ＩＤＬの５倍以下）程度の濃度の標準溶液を作成する。

<注>Ｓ／N比５以下ではベースライン補正にノイズの影響を強く受け、Ｓ／N比１５以上では相対標準偏差が小さくなりすぎるため、濃度とＳ／N比との関係はこの範囲内に収める。

Step-4　標準偏差（Sd）の算出（母集団標準偏差ではなく標本標準偏差であり、Sd は偏差平方和を（ｎ－１）で除した値の平方根）

Step-3 で作成した繰り返し試験用標準溶液を測定し、検量線から注入量又は濃度を求める。これを５回以上繰り返して標準偏差（Sd-s）を計算する。

検量線ブランク溶液に対象物質のピークが観察されない場合は、前述の Sd-s を繰り返し試験の標準偏差（Sd）とする。

検量線ブランク溶液に明瞭な対象物質のピークが観察された場合には、検量線ブランク溶液を５回以上繰り返し測定し、その標準偏差（Sd-b）を計算する。この場合には、Sd-s と Sd-b を比べ大きい方を Sd とする。

Step-5　装置検出限界（ＩＤＬ）の算定

ｎ回繰り返し試験を行った時のＩＤＬ（pg または pg／μL）は、次式により算定する。

$$\mathrm{IDL} = t\,(n-1,\ \alpha) \times \mathrm{Sd}$$

ここで、α：危険率で１％または５％のいずれかを採用する。

ｔ（n－1，α）：危険率１％（α=0.01）または危険率 5%（α=0.05)、自由度 n－1 におけるｔ値（片側）

Sd：Step-4 で計算した繰り返し試験の標準偏差

ｔ分布表

| 繰り返し回数(n) | 自由度(n－1) | 危険率５％（片側） | 危険率１％（片側） |
|---|---|---|---|
| 5 | 4 | ２．１３２ | ３．７４７ |
| 6 | 5 | ２．０１５ | ３．３６５ |
| 7 | 6 | １．９４３ | ３．１４３ |
| 8 | 7 | １．８９５ | ２．９９８ |
| 9 | 8 | １．８６０ | ２．８９６ |
| １０ | 9 | １．８３３ | ２．８２１ |
| １１ | １０ | １．８１２ | ２．７６４ |
| １２ | １１ | １．７９６ | ２．７１８ |

Step-6　試料濃度への換算

試料量、最終液量、装置注入容量等を勘案し、ＩＤＬを試料濃度に換算した値（試料濃度換算値）を求める。ＩＤＬを pg の単位で算出したときの計算式を以下に示す。

試料濃度換算値(ng／L)

＝｛(ＩＤＬ(pg)÷試料注入容量(μL)）×最終液量(mL)｝÷試料量(L)

Step-7　記録及び保存

ＩＤＬの算定に係る項目としては、対象物質名、注入量、繰り返し試験の１回ごとの結果、繰り返し試験平均値、標準偏差、ＩＤＬ及び試料濃度換算値等を記録する。また、くり返し試験のクロマトグラム及びワークステーション内の測定生データ、解析データをファイルとして保存しておく。

## ２－２　測定値の品質管理と評価

（1）検出下限値（ＭＤＬ）

試料の分析に先立ち、次の試験を行い分析法の検出下限値（ＭＤＬ：Method Detection Limit）を求め、各分析法の目標とするＭＤＬが達成できることを確認しておく。達成できない場合には、試料量を増やしたり、測定用試料液をより濃縮すること等で対応するが、その場合には手順を記録しておく。

①空試験において対象物質が検出されない場合

検量線の最低濃度の２～５倍（又は、ＩＤＬの２～５倍）になるように精製水に各分析法に記載の抽出溶媒に対象物質を添加して、所定の前処理、試料液の調製、測定の操作を行い、個々の測定値を求める。これらの値を試料中濃度に換算し、標準偏差(ｓ)から、次式によりＭＤＬを算出する。

ＭＤＬ＝ｔ（n－1，α）×ｓ

ここで、ｔ（n－1，α）は自由度 n－1 の危険率α（片側）のｔ値であり、次のｔ分布表の値を使用する。

| 繰り返し回数(n) | 自由度(ｎ－１) | 危険率５％（片側） | 危険率１％（片側） |
|---|---|---|---|
| 5 | 4 | ２．１３２ | ３．７４７ |
| 6 | 5 | ２．０１５ | ３．３６５ |
| 7 | 6 | １．９４３ | ３．１４３ |
| 8 | 7 | １．８９５ | ２．９９８ |
| 9 | 8 | １．８６０ | ２．８９６ |
| １０ | 9 | １．８３３ | ２．８２１ |
| １１ | １０ | １．８１２ | ２．７６４ |
| １２ | １１ | １．７９６ | ２．７１８ |

②空試験において対象物質が検出される場合

各分析法に示した空試験を５回以上繰り返す。個々の測定値を試料中濃度に換算し、標準偏差(ｓ)から、次式によりＭＤＬを算出する。

ＭＤＬ＝ｔ（n－1，α）×ｓ

ここで、ｔ（n－1，α）は自由度ｎ－１の危険率α（片側）のｔ値である。

算定したＩＤＬは、表５の「検出下限値（ＭＤＬ）及び定量下限値（ＭＱＬ）の算定記録表」に記録する。

ただし、空試験の測定値が高すぎたり、バラツキが大きければ、適切なＭＤＬが算出できない。このため、本法によるＭＤＬの算出は次の事項の確認が前提となるので注意が必要である。

・対象物質の検出原因が分析操作上の汚染と考えられる場合には、汚染の原因を究明し、操作ブランク値を可能な限り低減させておくこと。

・操作ブランク試験の繰り返し測定において、各測定値間のバラツキを十分に

小さくし安定させておくこと。許容できるバラツキの目安は、「操作ブランク値の平均値±(目標ＭＤＬの１／２)」以内である。

（２）定量下限値（ＭＱＬ）

ＭＤＬの３倍値をその分析法の定量下限値（ＭＱＬ：Method Quantification Limit）とする。

算定した定量下限値は、表５の「検出下限値（ＭＤＬ）及び定量下限値（ＭＱＬ）の算定記録表」に記録する。

（３）装置の感度変動の日常チェック

１日に１回以上、または、１０試料に１回以上、定期的に検量線の中間程度の標準液を測定し、装置感度が検量線作成時に比べて±２０%以内であることを確認する。これを超えて変動する場合にはその原因を究明し取り除いた後、それ以前の試料について再測定する。

（４）操作ブランク試験

操作ブランク試験は、試験液の調製または分析機器への導入操作等に起因する汚染を確認し、試料の分析に支障がない測定環境に設定するために行うものである。

操作ブランク値が大きいと測定感度が悪くなるばかりでなく、定量下限値が大きくなり測定値の信頼性が低下する。したがって、操作ブランク値は極力低減を図り、試料濃度への換算値が目標定量限界値以下になるよう管理する。試験頻度は、１０試料ごとに１回、または１日に１回（測定試料が１０試料以下）行う。

（５）添加回収試験

添加回収試験では、試料液中の濃度が定量下限値の１０倍量程度となるように測定対象の標準物質を試料マトリックスに添加して、所定の前処理、試料液の調製、測定の操作を行い、回収率が８０～１２０%の範囲にあることを確認する。同位体希釈法を用いた方法では、サロゲート標準物質の回収率は５０～１２０%の範囲にあることを確認する。ただし、操作ブランク値が大きかったり、試料中に対象物質が含まれる場合は、その濃度が回収率に影響しない程度に標準物質の濃度を増やして試験を行う。

回収率が許容できる範囲を大きく逸脱する場合は、その原因を究明した後、試料の再採取または粗抽出液から測定をやり直す。

回収率の測定は実試料の測定に先立ち行う。また、一連の試料の測定にあって、前処理や試料液の調製に用いる試薬の製造メーカーあるいはロットが異なるなど、回収率が変化する可能性があるときには、回収率の再確認を行う必要がある。

（６）二重測定

試料採取、前処理操作及び機器分析における総合的な信頼性を確保するために、同一条件で採取した２つ以上(原則として３つ)の試料について同様に分析する。頻度は１０試料ごとに１回を目安とする。

定量下限値以上の濃度の試料で２つ以上（３つ）の測定値の差が平均値に比べて３０%以下であることを確認する。測定値の差が大きい場合は、その原因を究明して取り除き、再測定を行う。

（7）トラベルブランク値の測定

トラベルブランク試験は、試料採取準備時から試料測定時までの汚染の有無を確認するためのものであり、採取操作以外は試料と全く同様に扱い、持ち運んだものを測定し、トラベルブランク値とする。

移送中に汚染が考えられる場合には、一連の試料採取において試料数の１０％程度の頻度で、少なくとも３試料以上行う。

ただし、トラベルブランク値を管理しておけば、毎回行う必要はないが、試料採取における信頼性を確保するため、前もってトラベルブランク値について十分検討しておき、必要に応じそのデータが提示できるようにしておく。

（8）異常値、欠測値の取り扱い

分析機器の感度の変動が大きい場合、二重測定の結果が大きく異なる場合、トラベルブランク値が大きく試料の汚染の可能性がある場合などには、測定値の信頼性に問題があるため、再測定を行ったり、そのデータは欠測扱いとして再測定を行う。

このような問題は、多大な労力、時間、コストがかかるだけでなく、異常値や欠測値が多くなると、調査結果全体の評価に影響するため、事前のチェックを十分に行い、異常値や欠測値を出さないように注意する。また、異常値や欠測値が出現した経緯を十分に検討し、記録に残しておき、以後の再発防止に役立てることが重要である。

（9）測定操作の記録

以下の情報を記録し、整理・保管しておく。

・試料採取に使用する装置や器具の調整、校正及び操作
・容器等の取り扱い及び保管の状況
・採取対象の条件及び状況（採取方法、採取地点、採取日時）
・試料に関する調査項目（水質：ｐＨ、有機物濃度、懸濁物質量など）
・試料調製条件
・分析装置の校正及び操作
・測定値を得るまでの各種の数値

表３　標準物質（標準溶液）記録表

| | | | |
|---|---|---|---|
| 分析対象物質名 | | | |
| 標準物質名 | | | |
| メーカー名 | | | |
| 規格 | | | |
| 容量 | | | |
| ＬＯＴ番号 | | | |
| 含有量 | | | |
| 濃度 | | | |
| 購入年月日 | 年　月　日 | | |
| 有効年月日 | | | |
| 開封年月日 | | | |
| 保管場所 | | | |
| 使用履歴 | 使用年月日 | 使用量 | 使用者名 |
| | 年　月　日 | | |
| | 年　月　日 | | |
| | 年　月　日 | | |
| | 年　月　日 | | |
| | 年　月　日 | | |
| | 年　月　日 | | |
| | 年　月　日 | | |
| | 年　月　日 | | |
| | 年　月　日 | | |
| | 年　月　日 | | |
| | 年　月　日 | | |
| | 年　月　日 | | |
| | 年　月　日 | | |
| | 年　月　日 | | |
| | 年　月　日 | | |
| 備考 | | | |

表４　装置検出下限値（ＩＤＬ）の算定記録表

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 分析対象物質名 | | | | | |
| 抽出試料量（ｍｌ） | | | | | |
| 最終液量（ｍｌ） | | | | | |
| 注入液濃度（μｇ／ｍｌ） | | | | | |
| ＧＣ／ＭＳ注入液量（μｌ | | | | | |
| ＧＣ／ＭＳ注入量（ｎｇ） | | | | | |
| 検量線ブランクの有無 | 有り　・　無し | | | | |
| 無しの場合 | | | 有りの場合、ブランク値 | | |
| 測定結果 | 1 | | 測定結果 | 1 | |
| | 2 | | | 2 | |
| | 3 | | | 3 | |
| | 4 | | | 4 | |
| | 5 | | | 5 | |
| | 6 | | | 6 | |
| | 7 | | | 7 | |
| | 8 | | | 8 | |
| | 9 | | | 9 | |
| | 10 | | | 10 | |
| | 11 | | | 11 | |
| | 12 | | | 12 | |
| 標準偏差（Ｓｄ－ｓ） | | | 標準偏差（Ｓｄ－ｂ） | | |
| 採用した標準偏差（Ｓｄ） | | | | | |
| 繰り返し回数（ｎ） | | | | | |
| 自由度（ｎ－１） | | | | | |
| ＩＤＬ（ｎｇ） | | | | | |
| ＩＤＬ試料濃度換算値（μｇ／ｌ） | | | | | |

表５　検出下限値（ＭＤＬ）及び定量下限値（ＭＱＬ）の算定記録表

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 分析対象物質名 | | | | | |
| 抽出試料量（ｍｌ） | | | | | |
| 最終液量（ｍｌ） | | | | | |
| 注入液濃度（μｇ／ｍｌ） | | | | | |
| ＧＣ／ＭＳ注入液量（μｌ） | | | | | |
| ＧＣ／ＭＳ注入量（ｎｇ） | | | | | |
| 空試験での対象物質の有無 | | 有り　・　無し | | | |
| 無しの場合（試料中濃度換算値） | | | 有りの場合、空試験値（試料中濃度換算値） | | |
| 測定結果 | 1 | | 測定結果 | 1 | |
| | 2 | | | 2 | |
| | 3 | | | 3 | |
| | 4 | | | 4 | |
| | 5 | | | 5 | |
| | 6 | | | 6 | |
| | 7 | | | 7 | |
| | 8 | | | 8 | |
| | 9 | | | 9 | |
| | 10 | | | 10 | |
| | 11 | | | 11 | |
| | 12 | | | 12 | |
| 標準偏差（Ｓ） | | | 標準偏差（Ｓ） | | |
| 繰り返し回数（ｎ） | | | 繰り返し回数（ｎ） | | |
| 自由度（ｎ－１） | | | 自由度（ｎ－１） | | |
| ＭＤＬ（μｇ／ｌ） | | | ＭＤＬ（μｇ／ｌ） | | |
| ＭＱＬ（μｇ／ｌ）<br>＝ＭＤＬ×３ | | | ＭＱＬ（μｇ／ｌ）<br>＝ＭＤＬ×３ | | |

## ３．水試料中イプロジオンの測定に関する標準作業手順書（ＳＯＰ）

### ３－１　分析法の概要、試薬類、器具および装置

（１）分析法の概要

　試料中のイプロジオンをジクロロメタンで溶媒抽出し、抽出液を脱水・濃縮・乾固後、アセトンで再溶解して内標準物質を添加し、ＧＣ／ＭＳ（ＳＩＭ）で定量する。検出限界値は 0.01～0.05 μg/L 程度を目標とする。

（２）試薬類

・標準品：イプロジオン標準品（残留農薬試験用　和光純薬工業）
・内標準物質：クリセン－$d_{12}$標準品（和光純薬工業）
・ジクロロメタン、アセトン、ヘキサン：残留農薬・ＰＣＢ試験用（和光純薬工業）
・塩化ナトリウム　残留農薬試験用（和光純薬工業）を 600℃で４時間加熱
・無水硫酸ナトリウム　残留農薬試験用（和光純薬工業）を 600℃で４時間加熱
・窒素ガス：高純度窒素１級（純度 99.999%以上）
・精製水：測定の妨害となる物質を含有しない超純水

（３）器具および装置

・分液ロート、共栓付試験管、メスフラスコなどのガラス器具
・振とう機
・ロータリーエバポレータ
・ガラス繊維ろ紙：孔径１μmであって測定の妨害となる物質を含まないもの
・超音波抽出器：超音波洗浄器または同等品
・ガスクロマトグラフ/質量分析計（ＧＣ／ＭＳ）

### ３－２　水質試料の抽出法

　懸濁物質量の多い試料水（目安としてＳＳ濃度 50μg/mL 以上）は予めガラス繊維ろ紙によるろ過を行い、懸濁物質とろ液を個別に抽出する。懸濁物質中のイプロジオンは、アセトンによる超音波抽出を行い、抽出液はろ液試料に移す。抽出と洗浄に用いるアセトンの量は、ろ液量の５%程度にとどめる。

　懸濁物質量の少ない試料水またはろ液は、その 500 mL を分液ロートにとり、塩化ナトリウム 25ｇおよびジクロロメタン 50 mL を加え、振とう機で１０分間抽出し、静置してジクロロメタン層を分取する。同様の抽出操作を繰り返し、ジクロロメタン抽出液は 300 mL 容の分液ロートに合わせ、ヘキサン 100 mL を加えて、無水硫酸ナトリウムで脱水する。ジクロロメタンとヘキサンの混合抽出液は、ロータリーエバポレータを用いて 2 mL まで濃縮する。

### ３－３　測定用試料溶液の調整

　水質試料の濃縮した抽出液に、窒素ガスを穏やかに吹き付けて溶媒を留去し、直ちに測定用内標準溶液を 1.0 mL 添加し、ＧＣ／ＭＳの試験液とする。

３－４　空試験液の調製

試料と同量の精製水をもちいて、３－２および３－３の操作を行い、空試料液を調製する。

３－５　標準液の調製

標準物質 100µg/mL アセトン溶液を標準原液とする。標準原液をアセトンで希釈し 1.0 µg/mL の標準溶液を調製する。測定用内標準溶液は、クリセン－$d_{12}$ をアセトンに溶解して 25 ng/mL に調製する。

３－６　ＧＣ／ＭＳ測定

（１）測定条件

①ガスクロマトグラフ（ＧＣ）

・カラム：ＨＰ－５ＭＳ（0.25㎜×30ｍ、0.25µｍ）
・液相：5%フェニルメチルシリコン
・カラム温度：50℃（2 分）－10℃/分－280℃(5 分)
・注入口温度：250℃
・注入法：スプリットレス（パージオフ時間１分）
・キャリアガス：ヘリウム（流量 2mL/min、線速度 42～51 ㎝/sec）

②質量分析計（ＭＳ）

・インターフェイス温度： 250℃
・イオン化エネルギー：70eV
・イオン源温度：250℃
・イオン化電流： 300µA
・イオン化法：電子衝撃イオン化（ＥＩ）法
・質量校正：ＭＳに質量校正用標準物質のＰＦＫを導入して、ＭＳの質量校正プログラムによりフラグメントパターンおよび分解能（５００以上）等の校正を行うと共に、装置の感度等の基本的なチェックを行い、これらの結果は測定結果と共に記録に残す。
・モニターイオン：

イプロジオン；(定量用）314
（確認用）316
クリセン－$d_{12}$ ；240

（２）検量線

検量線作成用の試験液２µL をＧＣ／ＭＳに注入し、得られたクロマトグラムの標準物質と内標準物質のピーク面積比および濃度比から検量線を作成する。

（３）定量

試料液２µL をＧＣ／ＭＳに注入し、得られたクロマトグラムの被検物質と内標準物質のピーク面積比により、検量線から定量する。

（４）計算

$$C(\mu g/L) = S_{abs}(ng) \times V_{conc}(mL) \times 1{,}000 / (V_{inj}(\mu L) \times V_{spl}(mL))$$

ここで、C　：　試料水中のイプロジオン濃度（μg/L）

$S_{abs}$：　検量線から求めた試料液中イプロジオン量(ng)

$V_{conc}$：試料液の最終液量(mL)

$V_{inj}$：　ＧＣ／ＭＳへの注入量(μL)

$V_{spl}$：　試料水量(mL)

## ４．品質管理報告書

分析は各対象物質ごとに定めた標準作業手順書（ＳＯＰ）に基づいて適正に行い、かつ、分析精度管理に関する以下の情報を記録し、分析データとともに報告する。

①現地調査及び試料採取に関すること

②標準物質及び内部標準物質に関すること

③装置検出下限値（ＩＤＬ）、検出下限値（ＭＤＬ）及び定量下限値（ＭＱＬ）に関すること

④ＧＣ／ＭＳのチューニングに関すること

⑤精度管理全般に関すること

・分析結果

・標準物質

・分析機器（ＧＣ／ＭＳ）の設定

・分析機器（ＧＣ／ＭＳ）の日常的点検

・検量線の作成等

・検出下限値等

・操作ブランク試験等

なお、分析データは、生データのチャート打ち出しだけでなく、ワークステーション内のデータファイル、データ処理ファイル（検量線、定量計算）等もファイル名をリストとして整理して保存しておく。

分析精度管理総括表
（1）分析結果

| | | | |
|---|---|---|---|
| 物　質　名 | | | |
| 分　析　法 | | | |
| 分析担当者 | | 分析開始日 | 年　　月　　日 |
| | | 分析終了日 | 年　　月　　日 |

| 試料番号 | 試料名 | 採取年月日 |
|---|---|---|
| | | 年　　月　　日 |
| | | 年　　月　　日 |
| | | 年　　月　　日 |
| | | 年　　月　　日 |
| | | 年　　月　　日 |
| | | 年　　月　　日 |
| | | 年　　月　　日 |
| | | 年　　月　　日 |
| | | 年　　月　　日 |
| | | 年　　月　　日 |

| 試料番号 | 分析結果<br>（μｇ／L) | 標準偏差<br>（μｇ／L) | 定量限界<br>（μｇ／L) | 測定回数<br>(回) |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

（２）標準物質及び内部標準物質

| 標準物質名 | 規格 | 容量 | メーカー名 | ＬＯＴ番号 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

| 内部標準物質名 | 規格 | 容量 | メーカー名 | ＬＯＴ番号 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

（3）分析機器（GC／MS）の設定

| 使用機器 | 名　　称 |
|---|---|
| GC部 | |
| MS部 | |

<table>
<tr><th>使用機器</th><th>分析条件</th></tr>
<tr><td>GC部</td><td>カラム<br>カラム温度<br><br>注入口温度<br>注入法<br>ヘッド圧</td></tr>
<tr><td>MS部</td><td>インターフェース温度<br>イオン源温度<br>イオン化電圧<br>イオン化電流<br>イオン化法<br>検出モード<br>モニターイオン<br><table>
<tr><th>物質名</th><th>定量イオン</th><th>参照イオン</th></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td></tr>
</table></td></tr>
</table>

（４）分析機器（ＧＣ／ＭＳ）の日常的点検

| 管理項目 | 設定値 | 応答値 | 判定 | 判定基準 | 備考 |
|---|---|---|---|---|---|
| オーブン温度 | | | | 設定値に対して正常に作動するか | |
| 注入口温度 | | | | 設定値に対して正常に作動するか | |
| イオン源温度 | | | | 設定値に対して正常に作動するか | |
| インターフェース温度 | | | | 設定値に対して正常に作動するか | |
| ヘッド圧 | | | | 設定値に対して正常に作動するか | |
| ＭＳチューニング | | | | 質量校正プログラムにより調整されているか | チューニング・レポートに記録 |
| 保持時間<br>物質名<br>(　　　　　) | | | | 標準物質の保持時間が５％の範囲内にあること | |
| 保持時間<br>物質名<br>(　　　　　) | | | | 同上 | |
| 保持時間<br>物質名<br>(　　　　　) | | | | 同上 | |

（5）検量線の作成等

<table>
<tr><td>対象物質名</td><td colspan="5"></td></tr>
<tr><td rowspan="4">定量方法：<br>内部標準法</td><td colspan="5">内部標準物質</td></tr>
<tr><td colspan="4">種類</td><td>添加量</td></tr>
<tr><td colspan="5">サロゲート物質</td></tr>
<tr><td colspan="4">種類</td><td>添加量</td></tr>
<tr><td rowspan="2">標準原液</td><td colspan="5">1．購入<br>濃度（　　　　　　　　）<br>溶媒の種類（　　　　　　）<br>メーカー名（　　　　　　）</td></tr>
<tr><td colspan="5">2．自作<br>濃度（　　　　　　　　）<br>溶媒の種類（　　　　　　　　）</td></tr>
<tr><td rowspan="6">検量線<br>(代表例)</td><td colspan="5">作成点数（　　　）</td></tr>
<tr><td colspan="5">検量線範囲（GC／MS注入量）及び測定値</td></tr>
<tr><td>範囲<br>(単位：　)</td><td>標準物質<br>面積</td><td>内部標準<br>面積</td><td>サロゲート<br>面積</td><td>面積比</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="5">検量線の回帰式</td></tr>
</table>

（6）検出下限値等

| | | 装置検出下限値<br>(装置検出限界値)<br>（ＩＤＬ） | 検出下限値<br>(検出限界値)<br>(ＭＤＬ) | 定量下限値<br>(定量限界値)<br>(ＭＱＬ) |
|---|---|---|---|---|
| | | 単位（　　　　） | 単位（　　　　） | 単位（　　　　） |
| 測定回数 | 1 | | | |
| | 2 | | | |
| | 3 | | | |
| | 4 | | | |
| | 5 | | | |
| | 6 | | | |
| | 7 | | | |
| | 8 | | | |
| | 9 | | | |
| | １０ | | | |
| | １１ | | | |
| | １２ | | | |
| 平均値 | | | | |
| 標準偏差 Sd | | | | |
| n | | | | |
| 自由度(n-1) | | | | |
| ｔ(n-1，α) | | | | |
| Sd×ｔ(n-1) | | | | |
| ＩＤＬ | | | ――― | |
| ＭＤＬ | | ――― | | |
| ＭＱＬ | | ――― | ――― | |
| ＳＯＰによる目標値 | | | | |

（7）操作ブランク試験等

| 操作ブランク試験結果（対象物質名：　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　） | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 媒体 | 試料量 | 測定値 | | | | | |
| | | 1回目 | 2回目 | 3回目 | 4回目 | 5回目 | 平均値 |
| 水質 | | | | | | | |
| | | | | | 検出限界値 | | |

| 添加回収試験結果（対象物質名：　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　） | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 添加濃度（水質：　　　　　　　　　μｇ／L） | | | | | | | |
| 媒体 | 測定値 | | | | | | |
| | 無添加 | 1回目 | 2回目 | 3回目 | 4回目 | 5回目 | 6回目 |
| 水質 | | | | | | | |
| | 7回目 | 8回目 | 9回目 | 平均値 | 回収率（%） | 変動係数（%） | |
| | | | | | | | |
| | | | | 検出限界値 | | | |

| トラベルブランク試験結果（対象物質名：　　　　　　　　　　　　　　　　　　） | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 媒体 | 試料量 | 測定値 | | | | | |
| | | 1回目 | 2回目 | 3回目 | 4回目 | 5回目 | 平均値 |
| 水質 | | | | | | | |
| | | | | | 検出限界値 | | |

## 付録５　イプロジオン物性表

| 実証機関 | 愛 知 県 | 環境技術開発者 | ㈱ホリバ・バイオテクノロジー |
|---|---|---|---|
| 製品の名称 | イプロジオン測定キットE | | |
| 測定対象物質名 | イプロジオン | | |
| 化　学　名 | 3-(3,5-dichlorophenyl)-N-isopropyl-2,4-dioxoimidazolidine-1-carboxamide | | |
| 分子式(分子量) | $C_{13}H_{13}O_3N_3Cl_2$ (330.18) | CAS No. | 36734－19－7 |
| 構　造　式 | | | |
| 物理化学的性状* | 外　　観 | 白色の結晶性粉末 | |
| | 融　　点 | 134℃ | |
| | 蒸 気 圧 | $5\times10^{-4}$ mPa (25℃) | |
| | 比　　重 | 1.00　(20 ℃) | |
| | log $P_{ow}$ | 3.0　(pH 3.5) | |
| | 溶 解 性<br>(g/L, 20℃) | 水: 0.013,　*n*-オクタノール: 10,　エタノール: 25,<br>アセトニトリル: 150,　ヘキサン: 590 | |
| | 安 定 性 | 酸性溶液中では比較的安定で、アルカリ溶液中では分解する。水溶液中では光に対して不安定。<br>$DT_{50}$：1～7 d (pH 7),　＜1 h (pH 9) | |
| 用　　途 | イミダゾリジン、ジカルボキシイミド系殺菌剤 | | |
| 規　制　等 | 公共用水域等における農薬の水質評価指針 0.3 mg/L | | |
| 備　　考 | イプロジオン代謝物の分子式（分子量）と構造式<br>$C_{13}H_{13}O_3N_3Cl_2$ (330.18) | | |

＊　上路雅子他編著：残留農薬分析法（2002 年版）,　p. 323　（ソフトサイエンス社）

平成１７年度環境技術実証モデル事業

化学物質に関する簡易モニタリング技術

実証試験結果報告書（イプロジオン）

平成１８年３月発行

愛知県環境調査センター

〒462－0032　名古屋市北区辻町流７－６
TEL 052－910－5494
FAX 052－991－6294

この冊子は再生紙を使用しています。

古紙配合率　100%　白色度　70%